UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TIAGO COSTA GOES

EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E DA LESÃO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO

ARACAJU
2016

TIAGO COSTA GOES **EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E DA LESÃO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO**

2016

TIAGO COSTA GOES

EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E DA LESÃO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO

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

Orientadora: Profa. Dra. Flavia Teixeira Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro

ARACAJU
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Goes, Tiago Costa
G598e Efeito do enriquecimento ambiental e da lesão do cortéx pré-frontal medial nos níveis de ansiedade-traço e -estado / Tiago Costa Goes ; orientadora Flavia Teixeira Silva ; co-orientador Murilo Marchioro. – Aracaju, 2016.
125 f.: il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Ácido quinolínico. 2. Ansiedade. 3. Córtex pré-frontal. I. Silva, Flavia Teixeira, orient. II. Marchioro, Murilo, co-orient. III. Título.

CDU 61

TIAGO COSTA GOES

EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E DA LESÃO DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO

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

Aprovada em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientadora: Prof. Dra. Flavia Teixeira Silva

_____

1º Examinador: Profa. Dra. Margarete Zanardo Gomes

_____

2º Examinador: Prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva

_____

3º Examinador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

_____

4º Examinador: Prof. Dr. Daniel Badaue Passos Junior

PARECER

A Deus. Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas!
Aos meus pais, à minha avó Ana Viana, à minha prima Magaly, à minha orientadora Profa. Dra. Flavia Teixeira e ao meu grande amigo Thiago Henrique, que sempre se fizeram presentes nos momentos em que eu mais precisei. O carinho, a força e a dedicação que de vós recebi, me fortaleceram e me impulsionaram a continuar a minha caminhada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Para chegar até aqui, muitos passos foram dados e muitas decisões tomadas... Para chegar até aqui, inúmeras pessoas cruzaram o meu caminho, porém poucas nele permaneceram... Para chegar até aqui, precisei de um alicerce intelectual, moral e espiritual. E agora, chegando aqui, quero agradecer, primeiramente, a DEUS, por estar sempre ao meu lado, iluminando o meu caminho, me dando força e coragem para superar os obstáculos desta vida, que afinal de contas não foram poucos.

Num momento como este, não posso deixar de agradecer, especialmente, as pessoas que preparam meu alicerce e as que me ajudaram a construir este momento.

Aos meus pais, José e Angela, que sempre me ensinaram o verdadeiro sentido da vida e que, mesmo em meio a tantas dificuldades que a vida lhes impôs, conduziram majestosamente os seus papéis de pai e mãe.

A minha prima, Magaly e, a minha avó Ana Viana, pela presença constante e edificante em todos os momentos da minha vida e, sem elas não teria alcançado muitas das minhas conquistas.

A minha orientadora Profa. Dra Flavia Teixeira, que com sua simplicidade, serenidade e sabedoria me mostrou que, para ser um bom doutor não basta apenas adquirir conhecimento científico, é preciso também aprimorar os valores morais. Foram 10 anos de uma boa convivência, muito aprendizado e uma amizade sincera e verdadeira. Desde meus primeiros passos na iniciação científica até a minha maior idade científica (doutorado), ela esteve sempre presente me preparando para a carreira científica e me ensinando a ensinar. Seus ensinamentos me fizeram progredir consideravelmente e, hoje percebo o quanto suas dicas foram fundamentais, a sua forma brilhante de corrigir os relatórios da minha iniciação científica, a dissertação do mestrado e esta tese (corrigia me sugerindo e nunca impondo as correções e/ou sugestões), as oportunidades que me ofereceu no laboratório (onde pude participar de estudos pré-clínicos e clínicos), os seus ensinamentos sobre os testes estatísticos, a sua forma sutil e elegante de me corrigir, o seu jeito de tomar uma decisão (ponderava sempre os prós e os contras) e, a forma pela qual se referia as ideias brilhantes que ela tinha (sempre se referia na primeira pessoa do plural e nunca na primeira do singular). Uma orientadora, literalmente, orientadora.

Ao meu grande amigo Thiago Henrique, um irmão que a vida me permitiu escolher. Destinado a me auxiliar nos experimentos, se mostrou bastante solícito e prestativo, um aluno

sem igual. A sua ajuda e presença constante foram fundamentais para a execução dos experimentos. Seu incentivo e as conversas descontraídas me ajudaram a superar os momentos de desânimo. Com sua paciência e simplicidade muito também contribuiu para minha formação intelectual e moral. Ele e Flavia foram peças-chave para esta conquista.

Por fim, não poderia deixar de agradecer, especialmente, a espiritualidade. A meu mentor espiritual e a toda equipe de espíritos de luz que sempre estiveram ao meu lado velando por meu sucesso, me acalmando nos momentos de desespero, me auxiliando nas tomadas de decisões e me norteando nas trilhas incertas dos meus passos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço também as pessoas maravilhosas que cruzaram o meu caminho e, que de uma forma ou de outra, deram a sua contribuição para a realização deste momento.

Aos meus irmãos, Lucas, Abraão, Thalita e Thaísa, por todo apoio e incentivo que sempre me deram.

Aos eternos laficanos (alunos do Laboratório de Fisiologia do Comportamento) que com o passar do tempo tornaram-se tão próximos que tempo algum os apagará da minha memória: Fabrício, Fábio, Pollyana, Camila, Flávia Garcez, André e Vânia, com os quais pude compartilhar um pouco do meu conhecimento e também com os quais muito aprendi.

Ao meu grande amigo e também eterno laficano Fabrício, pela ajuda nos experimentos do enriquecimento ambiental, pelas conversas descontraídas e por todo apoio e incentivo a minha carreira acadêmica.

Ao amigo Christopher Lloyd, pela construção dos aparatos dos modelos animais, pela disponibilidade e assessoria técnica do Anymaze e, pelo auxílio na escrita da versão em Inglês dos manuscritos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Murilo, aos alunos do Laboratório de Neurofisiologia, em especial a doutoranda Lívia, e ao Prof. Dr. José Ronaldo pelos ensinamentos e ajuda no preparo do encéfalo para análise histológica.

Às bolsistas Neuma e Dayanne que cuidaram com muito carinho dos nossos animais de experimentação.

Aos meus colegas do doutorado, em especial a doutoranda Iura, pela solicitude e pela carona amiga para as aulas no HU.

À Profa Dra Josimari, por suas contribuições no meu exame de qualificação e pela permissão do uso do aparelho criostato.

Ao Prof. Dr. Daniel Badaue, por suas contribuições no meu exame de qualificação, pela solicitude e presteza ao longo do meu doutoramento.

Ao Prof. Dr. Luis Felipe, por suas contribuições no meu exame de qualificação.

À Profa. Dra Fabiana, pela permissão do uso da lupa.

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

Aos professores do Departamento de Fisiologia, que me acolheram de braços abertos e sempre foram bastante solícitos e prestativos.

À Isabela, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela solicitude e presteza.

Aos membros da banca examinadora, por suas contribuições a versão final desta tese.

À sociedade brasileira pagadora de impostos.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

NOTA DE RECONHECIMENTO

Deixo explícito aqui meu reconhecimento do valor do uso de animais na construção do saber e do desenvolvimento científico de um povo.

“Mentes pequenas discutem sobre pessoas;
Mentes medianas discutem sobre eventos;
Grandes mentes discutem sobre ideias.”
Eleanor Roosevelt

RESUMO

Efeito do enriquecimento ambiental e da lesão do córtex pré-frontal medial nos níveis de ansiedade-traço e -estado. Tiago Costa Goes, Aracaju – SE, 2016. No estudo da ansiedade há dois conceitos distintos: a ansiedade-estado e a ansiedade-traço. A primeira é uma emoção que o indivíduo experimenta quando confrontado com um estímulo ameaçador e, a segunda, é um traço de personalidade relativamente estável ao longo do tempo e fator predisponente para os transtornos ansiosos. Apesar da relativa estabilidade, em animais, a ansiedade-traço parece ser sensível à influência de um enriquecimento ambiental, quando este é estabelecido após o desmame. Entretanto, não se sabe se esta influência também ocorre quando o enriquecimento é estabelecido na idade adulta. Também é desconhecido o substrato neural do perfil ansioso, mas evidências científicas apontam para um possível envolvimento do córtex pré-frontal medial (CPFM). Assim sendo, os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar o efeito do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade-traço e ansiedade-estado de ratos adultos (Experimento I); e 2) avaliar o efeito da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e ansiedade-estado de ratos adultos (Experimento II). Como, por definição, a ansiedade-traço modula a ansiedade-estado, esta também foi avaliada. No Experimento I, 70 ratos Wistar adultos foram primeiramente avaliados no paradigma da exploração livre (PEL – modelo animal de ansiedade-traço) para serem categorizados de acordo com seus níveis de ansiedade-traço (alto, médio e baixo). Subsequentemente, metade do número de animais de cada categoria retornou para sua gaiola (grupo condição padrão) e a outra metade foi exposta a um ambiente enriquecido (grupo condição enriquecida). Após três semanas, todos os animais foram novamente avaliados no PEL. Sete a dez dias após esta avaliação, 50 dos 70 animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE – modelo animal de ansiedade-estado). Os dados obtidos no PEL foram analisados por meio de análise de variância e teste *a posteriori* de Tukey, e os do LCE por teste t de Student. Os resultados mostraram que o ambiente enriquecido reduziu a atividade locomotora no PEL, independentemente da categoria de ansiedade e, diminuiu os níveis de ansiedade-traço dos animais com alto traço ansioso. Já no LCE, nenhum efeito do enriquecimento ambiental foi observado nos níveis de ansiedade-estado. No Experimento II, 66 ratos Wistar adultos foram primeiramente avaliados no PEL para serem categorizados de acordo com seus níveis de ansiedade-traço. Três a seis dias após esta exposição, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Metade do número de animais de cada categoria de ansiedade foi alocada para o grupo lesão do CPFM e a outra metade constituiu o grupo falsa lesão (grupo controle). Sete a nove dias após a cirurgia, todos os animais foram novamente testados no PEL. E, oito a dez dias após esta avaliação, foram testados na placa perfurada (PP – modelo animal de ansiedade-estado). Os dados obtidos tanto no PEL quanto na PP foram analisados por meio de análise de variância e teste *a posteriori* de Tukey. Os resultados mostraram que a lesão do CPFM, independentemente da categoria de ansiedade, aumentou a atividade locomotora na segunda exposição ao PEL em comparação com a primeira exposição e, diminuiu os níveis de ansiedade-traço de ratos com alto traço ansioso. Já na PP, a lesão do CPFM reduziu os níveis de ansiedade-estado dos animais de todas as categorias de ansiedade. Assim sendo, o presente estudo mostrou que o enriquecimento ambiental, estabelecido na idade adulta, foi capaz de diminuir os níveis de ansiedade-traço sem afetar os níveis de ansiedade-estado, ao passo que, a lesão do CPFM diminuiu tanto os níveis de ansiedade-traço quanto de ansiedade-estado de ratos Wistar adultos.

Palavras-chave: ácido quinolínico, labirinto em cruz elevado, paradigma da exploração livre, placa perfurada.

ABSTRACT

Effect of environmental enrichment and lesion of the medial prefrontal cortex in the trait and state anxiety levels. Tiago Costa Goes, Aracaju – SE, 2016. In the study of anxiety, there are two distinct concepts: state and trait anxiety. State anxiety is the anxiety a subject experiences at a particular moment in time, it is transitory and may be affected by external stimuli; whereas trait anxiety is considered an enduring feature of an individual, it is relatively stable over time and a predisposing factor for anxiety disorders. Despite its relative stability, in animals, trait anxiety seems to be sensitive to the influence of environmental enrichment established after weaning. Whether this influence also occurs when the enrichment is established in adulthood is still unknown. The brain structures implicated in trait anxiety are also unknown, but scientific evidences point to the medial prefrontal cortex (mPFC) Thus, the aims of this study were: 1) evaluate the effect of environmental enrichment in the levels of trait anxiety and state anxiety of adult rats (Experiment I); and 2) evaluate the effect of lesion of the mPFC in the levels of trait anxiety and state anxiety of adult rats (Experiment II). As, by definition, trait anxiety modulates state anxiety, this was also evaluated. In Experiment I, seventy adult Wistar male rats were first tested in the free-exploratory paradigm (FEP – animal model of trait anxiety) in order to be categorized according to their levels of trait anxiety (high, medium and low). Subsequently, half of the animals from each category returned to their home cages (standard condition) and the other half was transferred to an enriched environment (enriched condition). After three weeks, all animals were again tested in FEP. Seven to 10 days later, 50 of the 70 animals were tested on the elevated plus-maze test (EPM – animal model of state anxiety). The data from FEP were analyzed using ANOVA and Tukey's post hoc test, while the data from EPM were analyzed using Student's t test. In FEP, environmental enrichment reduced locomotor activity independently of the anxiety category and, it decreased the levels of trait anxiety of highly anxious rats. In EPM, no effect of environmental enrichment was observed in the levels of state anxiety. In Experiment II, 66 adult Wistar male rats were first tested in FEP and categorized according to their levels of trait anxiety. Three to six days after this exposure, all animals were submitted to stereotaxic brain surgery. Half of the animals from each anxiety category was allocated to the mPFC-lesioned group and the other half to the *Sham*-lesioned group. After seven to nine days, all animals were again tested in FEP. Eight to 10 days later, the animals were tested in the hole board test (HB – animal model of state anxiety). The data from both FEP and HB were analyzed using ANOVA and Tukey's post hoc test. In FEP, the mPFC lesion, independently of the anxiety category, increased locomotor activity in the second exposition to FEP in relation to first exposition to FEP and it decreased levels of trait anxiety of highly anxious rats. In HB, the mPFC lesion reduced the state anxiety of the animals of all anxiety categories. Thus, this study showed that the environmental enrichment, established in adulthood, was able to was able to decrease the trait anxiety levels without affecting the levels of state anxiety, whereas the lesion of the CPFM decreased both levels trait anxiety and state anxiety of adult Wistar rats.

Keywords: elevated plus-maze, free-exploratory paradigm, hole board test, quinolic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação das reações de ansiedade-estado e a influência da ansiedade-traço 14

Figura 2. Aparato do paradigma da exploração livre. A: vista lateral do aparato. B: vista superior do aparato contendo um animal explorando o lado novo (lado direito). O lado esquerdo representa o lado familiar.....42

Figura 3. Aparato do labirinto em cruz elevado, contendo um animal explorando um dos braços abertos.....43

Figura 4. Vista superior do aparato da placa perfurada, contendo um animal mergulhando a cabeça em um dos buracos 44

Figura 5. Vista superior do ambiente enriquecido contendo cinco animais e diversos objetos (túnel, roda giratória, blocos e cubos de madeira e de plástico, de vários tamanhos e cores) 45

Figura 6. Desenho experimental do experimento I 46

Figura 7. Desenho experimental do experimento II 49

Figura 8. Interação dos fatores Ambiente (CP e CE), Nível de ansiedade (alta, média e baixa) e Tempo (PEL1 e PEL2) 53

Figura 9. Diagrama esquemático de secções coronais do encéfalo de ratos ilustrando a extensão da lesão em cada nível de ansiedade-traço (alta, média e baixa) produzida pelo ácido quinolínico 56

Figura 10. Fotomicrografias de secção coronal do CPFM tratadas pelo método de coloração de Nissl.....57

Figura 11. Interação dos fatores Tratamento (Falsa lesão e Lesão), Nível de ansiedade (alta, média e baixa) e Tempo (PEL1 e PEL2).....59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com a CID-10 e o DSM-V 09

Quadro 2. Relação dos modelos animais de ansiedade-estado mais comuns 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do parâmetro DTP no PEL 52

Tabela 2. Resultados dos parâmetros avaliados no LCE 54

Tabela 3. Resultados da área da lesão 55

Tabela 4. Resultados do parâmetro DTP no PEL. 58

Tabela 5. Resultados dos parâmetros avaliados na PP 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EBA..... Porcentagem de entradas nos braços abertos

%TBA.....Porcentagem de tempo nos braços abertos

%TLN..... Porcentagem de tempo no lado novo

5-HT.....Serotonina

AMPA..... α-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

BZD.....Benzodiazepínicos

CE.....Condição enriquecida

CID.....Classificação Internacional de Doenças

CP.....Condição padrão

CPF.....Cortex pré-frontal

CPFM.....Córtex pré-frontal medial

DSM.....*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)

DTP..... Distância total percorrida

GABA.....Ácido gama-aminobutírico

HPA..... Hipotálamo-pituitária-adrenal

IDATE.....Inventário de ansiedade traço/estado

LAFICO..... Laboratório de Fisiologia do Comportamento

LCE.....Labirinto em cruz elevado

LZE.....Labirinto em zero elevado

NM..... Número de mergulhos

NMDA..... N-metil-D-aspartato

PEL..... Paradigma da exploração livre

PEL1 .....Primeira exposição ao paradigma da exploração livre

PEL2 .....Segunda exposição ao paradigma da exploração livre

PP .....Placa perfurada

SCA .....Sistema cerebral aversivo

SIC .....Sistema de inibição comportamental

SNC .....Sistema nervoso central

TAE.....Transportador de aminoácido excitatório

TFS..... Tampão fosfato salina

TM..... Tempo de mergulho

UFS.....Universidade Federal de Sergipe

SUMÁRIO

RESUMO ..... **x**
ABSTRACT ..... **xi**
LISTA DE FIGURAS ..... **xii**
LISTA DE QUADROS ..... **xiii**
LISTA DE TABELAS ..... **xiii**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **xiv**
1 INTRODUÇÃO **1**

2 REVISÃO DA LITERATURA **5**
2.1 Ansiedade 6
2.1.1 Transtornos de Ansiedade 7
2.1.2 Ansiedade-traço 9
2.1.2.1 Ansiedade-traço x ansiedade-estado 12
2.1.3 Substrato neural da ansiedade 15
2.1.3.1 Lesão excitotóxica 16
2.1.3.2 Substrato neural da ansiedade-estado 16
2.1.3.3 Substrato neural da ansiedade-traço 19
2.1.4 Neurotransmissores da ansiedade 21
2.1.4.1 Ácido gama-aminobutírico 22
2.1.4.2 Serotonina 23
2.1.4.3 Dopamina 24
2.1.4.4 Glutamato 27
2.2 Modelos animais de ansiedade 28
2.2.1 Modelos animais de ansiedade-traço 30
2.2.1.1 Paradigma da exploração livre 30
2.2.2 Modelos animais de ansiedade-estado 31
2.2.2.1 Labirinto em cruz elevado 33
2.2.2.2 Placa perfurada 34
2.3 Enriquecimento ambiental 34
2.3.1 Enriquecimento ambiental e ansiedade 36

3 OBJETIVOS 39
3.1 Objetivo Geral 40
3.2 Objetivos Específicos 40

4 ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS 41
4.1 Animais 42
4.2 Modelos animais de ansiedade 42
4.2.1 Paradigma da exploração livre – modelo animal de ansiedade-traço 42
4.2.2 Labirinto em cruz elevado – modelo animal de ansiedade-estado 43
4.2.3 Placa Perfurada – modelo animal de ansiedade-estado 44
4.3 Experimento I: Influência do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade-traço e -estado de ratos Wistar adultos 45
4.3.1 Enriquecimento ambiental 45
4.3.2 Procedimento 46
4.3.3 Análise estatística 47
4.4 Experimento II: Avaliação do efeito da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e –estado de ratos Wistar 48
4.4.1 Cirurgia estereotáxica 48
4.4.2 Análise histológica 49
4.4.3 Procedimento 49
4.4.4 Análise estatística 50
4.5 Ética 51

5 RESULTADOS 52
5.1 Experimento I: Influência do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade-traço e -estado de ratos Wistar adultos 53
5.1.1 Paradigma da exploração livre 53
5.1.1.1 Distância total percorrida 53
5.1.1.2 Porcentagem de tempo no lado novo 53
5.1.2 Labirinto em cruz elevado 54
5.1.2.1 Distância total percorrida 54
5.1.2.2 Porcentagem de tempo nos braços abertos 54
5.1.2.3 Porcentagem de entrada nos braços abertos 55

5.2 Experimento II: Avaliação do efeito da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e –estado de ratos Wistar 55
5.2.1 Resultado histológico 55
5.2.2 Paradigma da exploração livre 59
5.2.2.1 Distância total percorrida 59
5.2.2.2 Porcentagem de tempo no lado novo 59
5.2.3 Placa perfurada 61
5.2.3.1 Distância total percorrida 61
5.2.3.2 Número de mergulhos 61
5.2.3.3 Tempo de mergulho 62

6 DISCUSSÃO 63

7 CONCLUSÃO 71

REFERÊNCIAS 73

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO (ARTIGO I) 98

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO (ARTIGO II) 100

ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO E INDIRETAMENTE RELACIONADOS À TESE 101

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade pode ser definida como uma resposta orgânica de apreensão e aumento da vigilância que ocorre em situações em que a fonte do perigo é incerta, desconhecida. No entanto, esta resposta pode persistir além da utilidade e se tornar patológica (STEIMER, 2011). Neste caso, a ansiedade é considerada um transtorno psiquiátrico e, como tal, se apresenta como o transtorno mais prevalente na população geral (KESSLER et al., 2005; KESSLER et al., 2012; VIANA; ANDRADE; 2012). Além disso, os transtornos de ansiedade são considerados como o terceiro transtorno mental mais caro da Europa, acarretando um impacto econômico de bilhões de euros (OLESEN et al., 2012). Estes fatos têm justificado um crescente número de estudos com o objetivo de melhor compreender essa emoção.

O estudo da ansiedade deve distinguir, conceitualmente e operacionalmente, a ansiedade como um estado transitório e como um traço de personalidade relativamente estável. Assim sendo, define-se como ansiedade-estado uma emoção que um indivíduo experimenta quando confrontado com um estímulo ameaçador e, como ansiedade-traço uma disposição pessoal a ver o mundo como mais perigoso (SPIELBERGER et al., 1972).

Embora a ansiedade-traço seja um traço de personalidade relativamente estável ao longo do tempo (SPIELBERGER et al., 1972), ela parece sofrer influências do ambiente. Chapillon e colaboradores (1999) mostraram que o enriquecimento ambiental, estabelecido desde o desmame, é capaz de produzir camundongos adultos com menor traço ansioso que aqueles criados em ambiente padrão de laboratório.

A definição de enriquecimento ambiental seria “um aumento das possibilidades de estimulação e interação física e social no ambiente” (WILL et al., 2004). No caso de animais de laboratório, o enriquecimento ambiental refere-se às condições de alojamento, consistindo de gaiolas ou câmaras de exploração que permitam uma maior estimulação sensorial, cognitiva e locomotora em comparação com as gaiolas padrão (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006).

Assim, sabe-se que animais que crescem num ambiente de maior estimulação física e social apresentam um perfil menos ansioso. No entanto, ainda resta saber se este mesmo ambiente, dito enriquecido, seria capaz de modificar a ansiedade-traço de animais já adultos, já que é sabido que o cérebro é dotado de plasticidade, ou seja, de uma capacidade de promover mudanças em suas estruturas e funções (MAINARDI et al., 2010; HIRASE; SHINOHARA, 2014; SCHAEFERS, 2015).

Vários estudos têm demonstrado que estimulações ambientais eliciam no cérebro respostas plásticas, como melhora na memória e na aprendizagem (HULLINGER et al., 2015); aumento da neurogênese no hipocampo (GRÉGOIRE et al., 2014; HAMILTON et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2014) e diminuição dos níveis de ansiedade (AHMADALIPOUR et al., 2015). Dessa forma, uma questão interessante a ser levantada neste ponto seria se o traço ansioso de animais criados em gaiolas padrão, desde o nascimento, poderia ser influenciado por um meio enriquecido estabelecido na idade adulta. Neste caso, o ambiente enriquecido estaria promovendo alterações plásticas em estruturas encefálicas relacionadas com o traço ansioso. Contudo, estas estruturas ainda não são conhecidas, pois há poucos estudos na literatura investigando o substrato neural da ansiedade-traço.

Dentre as regiões encefálicas investigadas, a que parece estar envolvida com a ansiedade-traço é o córtex pré-frontal medial (CPFM). Estudos de imagem em humanos têm mostrado que o CPFM apresenta uma correlação volumétrica inversa com a ansiedade-traço, de modo que indivíduos com alto traço ansioso apresentam uma menor espessura do CPFM e, indivíduos com baixo traço ansioso uma maior espessura (SPAMPINATO et al., 2009; GORKA et al., 2014). Além disso, foi observado, em estudos de imagem em animais de experimentação, que indivíduos com alto traço ansioso apresentam uma maior atividade do CPFM em comparação aos indivíduos de média ansiedade-traço (PRINSSEN et al., 2012). Não obstante, estudos de lesão excitotóxica em animais de laboratório constataram que ratos com lesão do CPFM apresentavam menores níveis de ansiedade-estado em comparação aos ratos do grupo controle (LACROIX et al., 2000; SHAH; TREIT, 2003). É possível que esta redução na ansiedade-estado esteja relacionada a uma diminuição nos níveis de ansiedade-traço, já que, por definição, ansiedade-traço modula a ansiedade-estado.

Seria, assim, o CPFM parte do substrato neural da ansiedade-traço? Estudos de lesão, que têm por finalidade investigar funções cerebrais, por meio da destruição de uma região do encéfalo e avaliação subsequente do comportamento do animal, poderiam responder a esta questão (CARLSON, 2013).

Levando tudo isso em consideração, seria de grande interesse, tanto científico quanto clínico, a avaliação da influência do ambiente no traço ansioso, bem como a investigação do substrato neural deste traço de personalidade, já que a ansiedade-traço é considerada um fator predisponente para o desenvolvimento de transtornos ansiosos (STEIMER, 2011).

Aqui, cabe destacar que, considerando-se que a ansiedade-traço modula a ansiedade-estado, seria interessante também avaliar os efeitos das intervenções supracitadas nos níveis de ansiedade-estado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANSIEDADE

A ansiedade, apesar de ser amplamente difundida na literatura psicológica, é considerada um termo confuso, pois há pouca concordância entre as diferentes definições apresentadas por vários estudiosos (PESSOTI, 1978), chegando mesmo a ser considerada como indefinível (LADER, 1972). Mesmo sem uma definição exata, ela pode ser facilmente notada. No homem, ela é percebida como uma emoção caracterizada por um alerta tenso e fisicamente exaustivo, focalizado em um perigo ou emergência iminente e inevitável, ainda que não objetivamente aparente, com uma incerteza dolorosa sobre a possibilidade de se resolver a situação. Sendo esta emoção também acompanhada por uma ativação do sistema nervoso autônomo (MARTIN, 1998).

A palavra ansiedade provém do termo grego *Anshein*, que significa "estrangular, sufocar, oprimir". Já angústia, seu termo correlato, origina-se do latim, sendo que *angor* significa opressão ou falta de ar. Alguns autores fazem distinção entre ansiedade e angústia, porém não há consenso. Tais termos remetem, metaforicamente, à experiência subjetiva característica da ansiedade (GRAEFF, 1997).

Tradicionalmente, as manifestações de ansiedade são divididas em dois tipos (EDELMANN, 1992): 1) Manifestações subjetivas ou psíquicas; e 2) Manifestações objetivas, que são passíveis de observação direta.

As manifestações subjetivas ou psíquicas envolvem sensações de estrangulamento, preocupações excessivas, dificuldades de concentração e insônia. Já as manifestações objetivas, também denominadas de respostas fisiológicas ou respostas de estresse[1], envolvem alterações do sistema nervoso autônomo e endócrino. As alterações autonômicas produzem aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e da frequência respiratória, sudorese, urgência de micção ou defecação. Ao passo que, as alterações hormonais envolvem a mobilização do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) com aumento dos níveis do hormônio adrenocorticotrófico na corrente sanguínea, resultando no aumento da liberação de corticoides adrenais (GRAEFF et al., 1997; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010).

A ansiedade parece estar intimamente relacionada ao medo, uma resposta emocional básica frente a um estímulo ameaçador, cuja circuitaria neural está envolvida em alguns tipos

[1] O termo **estresse**, introduzido pela primeira vez em 1914 pelo fisiologista Walter Cannon, refere-se às reações fisiológicas causadas pela percepção de situações aversivas ou ameaçadoras (CARLSON, 2013).

de ansiedade (LeDOUX, 1998). Apesar de relacionados, ansiedade e medo são estados emocionais distintos. Enquanto o medo é uma resposta a uma ameaça externa, conhecida, definida, a ansiedade, em contraste, é um estado de humor voltado para o futuro, cujas causas são difíceis de especificar, sendo muitas vezes provocada por ameaças menos específicas e menos previsíveis ou por razões que são fisicamente ou psicologicamente mais distantes e potenciais, associadas com excitação e vigilância (BRANDÃO, 2008; DAVIS et al., 2010).

A ansiedade, assim como o medo, apresenta importante valor adaptativo e evolutivo, uma vez que leva o indivíduo a evitar danos físicos ao organismo ou possíveis prejuízos psicológicos. Desta forma, ela estimula o organismo a adotar as medidas necessárias para impedir uma ameaça ou, no mínimo, reduzir as suas consequências. Além disto, uma certa dose de ansiedade parece ser necessária para um bom desempenho em tarefas cognitivas (BRANDÃO, 2008; GRAEFF, 2005). Assim, a ansiedade é uma emoção normal sob circunstâncias de ameaça e acredita-se ser parte de uma reação evolucionária de sobrevivência de "luta-ou-fuga". Ao passo que pode ser normal ou ainda adaptativo estar ansioso diante de situações de ameaça à sobrevivência ou diante dos estressores da vida moderna, há muitas circunstâncias nas quais a presença da ansiedade é mal-adaptativa e se constitui num transtorno psiquiátrico (STAHL, 2013).

2.1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

O transtorno mental no qual a ansiedade é a principal manifestação sintomatológica é denominado como transtorno de ansiedade e, está presente em 28,8% da população geral (KESSLER et al., 2005). Em todas as formas deste transtorno, quatro componentes sintomáticos estão presentes, a saber: 1) manifestações cognitivas; 2) manifestações somáticas; 3) manifestações comportamentais; e, 4) manifestações emocionais. As manifestações cognitivas envolvem pensamentos de apreensão por algum desfecho desfavorável, relacionados com eventos do cotidiano do indivíduo, sensação subjetiva de tensão, irritabilidade, nervosismo, mal-estar indefinido, etc. As manifestações somáticas englobam sintomas físicos ou somáticos relacionados à hiperativação do sistema nervoso autônomo e do eixo HPA e a tensão muscular. As manifestações comportamentais são expressas por meio de sobressaltos, insônia, inquietação e esquiva fóbica ou rituais compulsivos. Já as manifestações emocionais englobam vivências subjetivas de desconforto e de desprazer (BERNIK, 1999; BRAGA et al., 2010).

Os transtornos de ansiedade só começaram a ser considerados entidade clínica no final do século XIX, quando o psiquiatra norte-americano G. M. Beard denominou o termo neurastenia para descrever pacientes com graus menores de ansiedade e transtornos depressivos leves. O termo neurastenia foi separado de "neurose de ansiedade" somente alguns anos depois, pelo neurologista Sigmund Freud, em sua última classificação. Nesta, Freud também distinguiu ansiedade crônica de ataques de ansiedade; e, foi com ele que o estudo da ansiedade adquiriu uma grande proeminência na Psiquiatria (FIGUEIREDO, 2004; GRAEFF, 1997).

O desenvolvimento do primeiro sistema de classificação dos transtornos mentais, que levava em conta a origem orgânica das doenças psiquiátricas, data do início do século XX e é atribuído ao psiquiatra alemão Emil Kraepelin, que buscou identificar padrões de sintomas que permitissem a construção de diagnósticos sindrômicos (ARAÚJO; NETO, 2013). Na mesma época, uma nomenclatura psiquiátrica foi desenvolvida pelo Exército norte-americano (e modificada pela Associação dos Veteranos) para aplicação nos ambulatórios que prestavam atendimentos a combatentes e veteranos da Segunda Guerra Mundial. Esta nomenclatura resultou numa seção dedicada aos transtornos mentais na Classificação Internacional de Doenças em sua sexta edição (CID-6), publicada pela Organização Mundial de Saúde em 1948 (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002; ARAÚJO; NETO, 2013).

Apesar do mérito de ser uma classificação internacional, a CID-6 não contemplava alguns quadros importantes como síndromes cerebrais crônicas, vários transtornos de personalidade e reações situacionais transitórias, fato que restringiu sua aceitação nos Estados Unidos e motivou o uso de classificações alternativas neste país. Assim, em 1952 a Associação Americana de Psiquiatria publicou o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, conhecido como DSM, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (FIGUEIREDO, 2004).

Em virtude da complexidade dos transtornos mentais e os de ansiedade, em particular, a CID e o DSM tem passado por uma série de atualizações desde a sua constituição, de forma que, a CID se encontra na décima edição (CID-10) e o DSM na quinta (DSM-V). O quadro 1 lista as principais categorias diagnósticas dessas duas classificações, nas quais a ansiedade é o principal sintoma psicopatológico.

Quadro 1. Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com a CID-10 e o DSM-V.

CID-10	DSM-V
F40 Transtornos fóbicos-ansiosos F40.00 Agorafobia sem transtorno de pânico F40.01 Agorafobia com transtorno de pânico F40.1 Fobias sociais F40.2 Fobias específicas (isoladas) F40.8 Outros transtornos fóbicos-ansiosos F40.9 Transtorno fóbico-ansioso, não especificado F41 Outros transtornos de ansiedade F41.0 Transtorno de pânico F41.1 Transtorno de ansiedade generalizada F41.2 Transtorno misto de ansiedade e depressão F41. 3 Outros transtornos mistos de ansiedade F41.8 Outros transtornos de ansiedade especificados F41.9 Transtornos de ansiedade, não especificados F42 Transtorno obsessivo-compulsivo F42.0 Predominantemente pensamentos obsessivos e ruminantes F42.1 Predominantemente atos compulsivos (rituais obsessivos) F42.2 Pensamentos e atos obsessivos mistos F42.8 Outros transtornos obsessivo-compulsivos F42.9 Transtorno obsessivo-compulsivo, não especificado F43 Reação a estresse grave e transtorno de ajustamento F43.0 Reação aguda a estresse F43.1 Transtorno de estresse pós-traumático F43.2 Transtorno de ajustamento F43.8 Outras reações a estresse grave F43.9 Reações a estresse grave, não especificada	300.00 Transtorno de ansiedade não especificado 300.01 Transtorno de pânico sem agorafobia 300.02 Transtorno de ansiedade generalizada 300.21 Transtorno de pânico com agorafobia 300.22 Agorafobia sem histórico de transtorno de pânico 300.23 Transtorno de ansiedade social (fobia social) 300.09 Outro transtorno de ansiedade especificado 300.29 Fobia específica 309.21 Transtorno de ansiedade de separação

2.1.2 ANSIEDADE-TRAÇO

Por muitos anos, a natureza e a quantidade de traços de personalidade foi uma controvérsia. Hoje, porém, já é de comum acordo de que há cinco principais traços de personalidade (denominados de “Big Five”): abertura a experiência, consciência, socialização,

extroversão e neuroticismo ou ansiedade-traço (EYSENCK, 2004). Aqui, o traço de personalidade abordado será o de ansiedade, ou seja, a ansiedade-traço.

Importantes contribuições para a construção do conceito de ansiedade-traço advieram dos resultados oriundos de dois estudos que mostraram haver uma relação entre ansiedade duradoura e diferenças individuais na propensão à ansiedade. No primeiro estudo, realizado por Malmo (1957 apud SPIELBERGER, 1966), foi constatado que pacientes com alto nível de ansiedade duradoura apresentavam maior reatividade e variabilidade em diferentes medidas psicológicas e fisiológicas de ansiedade, independentemente da situação ser ou não estressora, em comparação com voluntários normais. No segundo estudo, Spence (1958 apud SPIELBERGER, 1966) demonstrou que, numa população normal, indivíduos que apresentavam maiores escores em um questionário de ansiedade se mostraram mais ansiosos cronicamente do que os indivíduos com baixo escores.

De posse desse conhecimento e, considerando que o traço de personalidade é uma característica duradoura, Spielberger propõe uma definição para o traço ansioso. Segundo ele, ansiedade-traço é definida como diferenças individuais relativamente estáveis na propensão à ansiedade, isto é, diferenças na tendência de reagir a situações percebidas como ameaçadoras com elevações de intensidade no estado ansioso (SPIELBERGER, 1970). Como um conceito psicológico, a ansiedade-traço parece ter características de duas classes distintas de constructos, uma que Atkinson (1964 *apud* BIAGGIO et al., 1977) chamou "motivos" e outra a que Campbell (1963 *apud* BIAGGIO et al., 1977) se referiu como "disposições comportamentais adquiridas". Enquanto motivos são definidos como disposições que permanecem latentes até que uma situação as ative, as disposições comportamentais adquiridas, envolvem resíduos de experiências passadas, que predispõem um indivíduo tanto a ver o mundo de determinada forma quanto a manifestar reações objetivas e realísticas. Seja como um motivo ou como uma disposição comportamental adquirida, a ansiedade-traço implica uma visão de mundo no qual uma larga faixa de situações é percebida como ameaçadoras e há uma tendência a responder a estas ameaças com aumento das reações de ansiedade (SPIELBERGER, 1966).

A natureza da ansiedade-traço pode ser explicada, basicamente, por duas abordagens: uma biológica e outra cognitiva. Enquanto a visão biológica busca entender como fatores biológicos determinam as diferenças individuais na propensão à ansiedade, a abordagem

cognitiva investiga como os vieses sistemáticos no processamento da informação determinam essas diferenças (CALVO; CANO-VINDEL, 1997).

Historicamente, a proposta de uma abordagem biológica da ansiedade-traço partiu dos trabalhos de Eysenck (1967) e Gray (1982) ao associarem diferenças individuais na propensão à ansiedade a atividade de estruturas encefálicas. De acordo com Eysenck, as diferenças entre indivíduos com alta e baixa ansiedade-traço poderiam ser explicadas em termos de limiar diferencial de atividade do hipotálamo, em que o alto traço ansioso seria associado a uma maior reatividade do sistema nervoso simpático. Já Gray, afirmou que a propensão à ansiedade dependeria de uma maior reatividade de um sistema cerebral que ele denominou de sistema de inibição comportamental (CALVO; CANO-VINDEL, 1997; EYSENCK, 2006). Como será visto mais adiante, tanto o hipotálamo quanto as estruturas encefálicas do sistema de inibição comportamental fazem parte, na verdade, do substrato neural da ansiedade-estado. Por outro lado, hoje já se sabe, que estas estruturas estão sob controle modulatório do córtex pré-frontal (CPF; BRANDÃO et al., 2003; RIBAS, 2007), e que indivíduos com alta ansiedade-traço apresentam uma deficiência neste controle (BISHOP, 2009), o que poderia acarretar num aumento da reatividade do hipotálamo e do sistema de inibição comportamental.

No que concerne a abordagem cognitiva, a ansiedade-traço tem sido associada basicamente a presença de dois vieses cognitivos, a saber: o viés atencional e o viés interpretativo. O primeiro diz respeito à tendência em dar mais atenção a um estímulo ameaçador em detrimento de um estímulo neutro, e o segundo, é uma tendência do indivíduo a interpretar uma situação ou estímulo ambíguo como sendo ameaçador. Há várias evidências mostrando que indivíduos com alta ansiedade-traço apresentam ambos os vieses cognitivos, ao passo que os de baixa ansiedade não apresentam. 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 (CALVO; CANO-VINDEL, 1997; EYSENCK, 2004).

Embora alguns teóricos tratem essas duas abordagens como fenômenos distintos, elas mais parecem ser causa e consequência uma da outra. Vieses cognitivos ocorrem por que a estrutura encefálica envolvida com o processamento cognitivo apresenta alguma alteração funcional. Foi demonstrado, por exemplo, que um aumento da atividade do CPF gera um aumento de vieses interpretativos (CLARKE et al., 2014). Assim, as diferenças entre

indivíduos com diferentes níveis de ansiedade-traço poderiam ser explicadas em termos biológicos com consequência cognitiva.

A busca pelo entendimento das bases psicobiológicas da ansiedade-traço vem cada vez mais ganhando espaço no campo da Psicologia e da Psiquiatria, especialmente por que o traço ansioso é um fator predisponente para o desenvolvimento de transtornos ansiosos (STEIMER, 2011). Estudos têm constatado que pacientes com diferentes quadros ansiosos apresentam maiores níveis de ansiedade-traço quando comparados a indivíduos saudáveis (KENNEDY et al., 2001; BIELING et al., 1998).

Para Spielberger (1972), indivíduos com alto traço ansioso são mais vulneráveis ao estresse e reagem a uma ampla faixa de situações como perigosas ou ameaçadoras. Como consequência disto, tem sido demonstrado que esses indivíduos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de hipertensão arterial (GARCEZ et al., 2014), de dor orofacial (MATOS et al., 2011) e de ideação suicida (SCHAEFER et al., 2012).

2.1.2.1 ANSIEDADE-TRAÇO X ANSIEDADE-ESTADO

A distinção de ansiedade como um traço de personalidade de ansiedade como um estado transitório emergiu dos estudos de Cattell e Scheier (1958; 1961). Estes pesquisadores, utilizando uma abordagem analítico-fatorial, identificaram dois fatores distintos na ansiedade que eles denominaram de ansiedade-traço e ansiedade-estado. O fator ansiedade-traço foi interpretado como medindo diferenças individuais estáveis numa unidade, uma característica de personalidade relativamente permanente. Já o fator ansiedade-estado foi definido como um estado transitório ou condição do organismo que flutua ao longo do tempo.

Apesar da distinção entre ansiedade-traço e ansiedade-estado ter sido feita inicialmente por Cattell e Scheier, ela só ganhou notoriedade alguns anos depois com a publicação dos trabalhos de Spielberger, especialmente, com a publicação do Inventário de Ansiedade Traço/Estado (IDATE; SPIELBERGER et al., 1970), considerado, na atualidade, como um dos questionários de autoavaliação de ansiedade mais utilizado em todo o mundo (FERNÁNDEZ-BLÁZQUEZ et al., 2015). Na publicação do IDATE, Spielberger apresenta as definições para a ansiedade-traço e a ansiedade-estado. A definição da primeira já foi anteriormente mencionada. A segunda é definida como sendo um 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 uma 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 pessoalmente perigosas ou ameaçadoras (SPIELBERGER, 1972).

Os conceitos de ansiedade-traço e ansiedade-estado podem ser considerados como análogos, em certos aspectos, aos conceitos físicos de energia potencial e energia cinética. A ansiedade-traço, como a energia potencial, indica diferenças na força de uma disposição latente para manifestar um certo tipo de reação. Ao passo que, a ansiedade-estado, como a energia cinética, se refere a um processo ou reação empírica que acontece num dado momento e a um determinado nível de intensidade (BIAGGIO; NATALICIO, 1979).

Existe uma relação clara entre ansiedade-traço e ansiedade-estado. A figura 1 mostra o processo pelo qual ocorre a ativação das reações de ansiedade-estado e como a ansiedade-traço influencia estas reações. As reações de ansiedade-estado, tais como sentimentos subjetivos de apreensão, expectativa ansiosa, ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo HPA, são desencadeadas a partir do momento que um estímulo é avaliado, conscientemente ou inconscientemente, como ameaçador. A fonte dos estímulos pode ser externa e/ou interna. A externa é proveniente do ambiente e a interna é fruto da percepção das alterações fisiológicas decorrentes da resposta ansiosa. Quando os estímulos são avaliados como não ameaçadores, as reações de ansiedade-estado não são provocadas. Diferenças individuais na propensão à ansiedade (ansiedade-traço) irão influenciar a avaliação do estímulo (SPIELBERGER, 1966). Assim, indivíduos com alto traço ansioso, por exemplo, avaliam uma mais larga faixa de situações ou estímulos como perigosos ou ameaçadores, experimentando reações de ansiedade-estado mais frequentemente, e muitas vezes com maior intensidade que os indivíduos com baixa ansiedade-traço (SPIELBERGER, 1972).

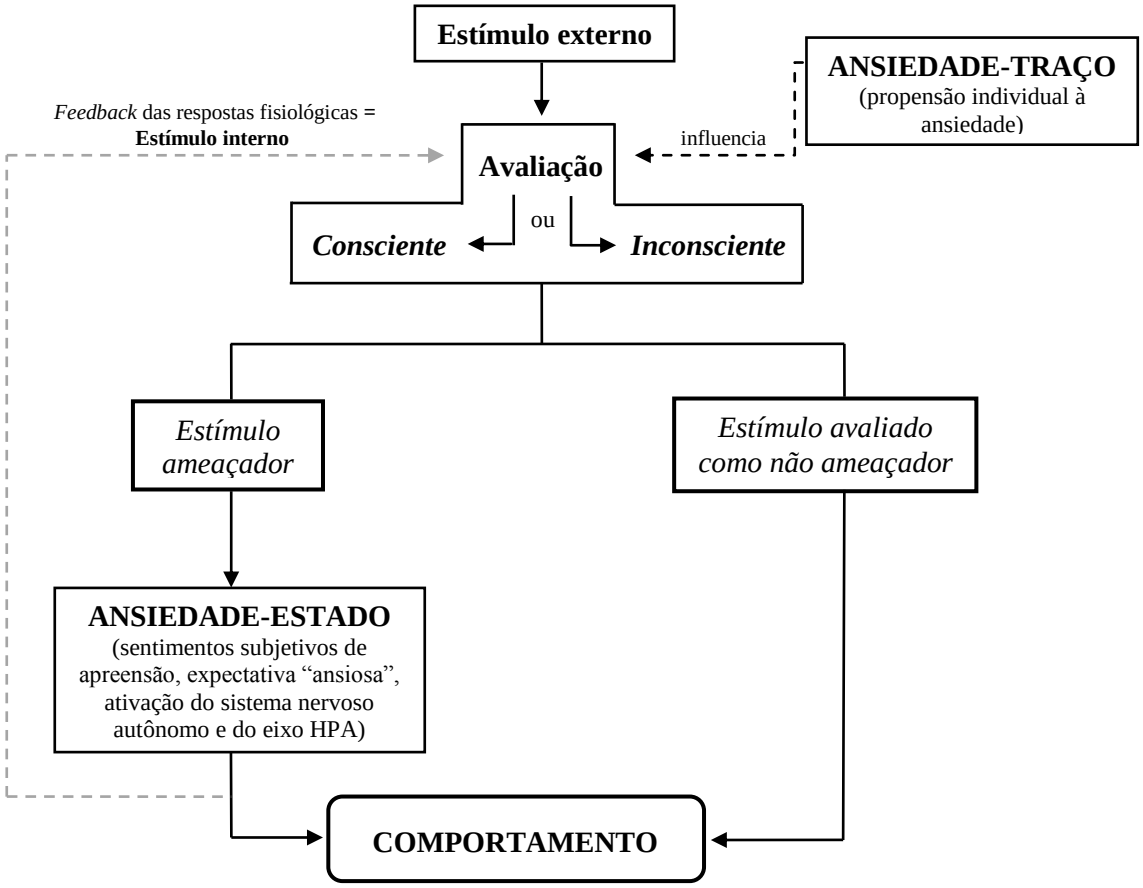

Figura 1. Ativação das reações de ansiedade-estado e a influência da ansiedade-traço (Modificado de SPIELBERGER, 1966).

Na concepção de Spielberger, a ansiedade-traço é um constructo unidimensional, ou seja, há apenas um traço de ansiedade geral o qual é capaz de predispor a um aumento das reações de ansiedade-estado em uma variedade de situações ameaçadoras (SPIELBERGER, 1985 *apud* ENDLER; KOCOVSKI, 2001). No entanto, Endler e colaloradores discordam desta teoria, já que para eles a ansiedade-traço é um constructo multidimensional, sendo constituída por quatro facetas: avaliação social, perigo físico, ambiguidade e rotina diária. Assim, para que haja aumento da ansiedade-estado a situação ameaçadora deve ser congruente com a faceta de traço a ser investigada (ENDLER; KOCOVSKI, 2001; ENDLER et al., 1991).

Embora importante e, até mesmo, testada cientificamente (ENDLER, 1997; FLETT et al., 1999), a ideia de ansiedade-traço como um constructo multidimensional não tem sido muito explorada pela comunidade científica, haja vista que a literatura praticamente não trás

trabalhos recentes com esta abordagem. Entretanto, mesmo a teoria da unidimensionalidade da ansiedade-traço, que parece ser a mais aceita e a mais explorada pelos pesquisadores, deve ser empregada com cautela. Por exemplo, um trabalho recente utilizando o IDATE, uma escala de auto-avaliação que adota a abordagem unidimensional, investigou se indivíduos com alta ansiedade-traço apresentariam altos níveis de ansiedade-estado em duas situações ansiogênicas distintas, uma de ameaça física e outra de ameaça interpessoal. Os pesquisadores constataram que o traço ansioso só modulou a ansiedade-estado apenas na situação de ameaça interpessoal, demonstrando que parece não haver apenas um traço de ansiedade geral como era de se esperar (LEAL, 2013).

2.1.3 SUBSTRATO NEURAL DA ANSIEDADE

O estudo da ansiedade e do medo teve início nos relatos de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem. Em sua obra "A expressão das emoções no homem e animais" (*The Expression of Emotion in Man and Animals*), publicada em 1872, Darwin expressou que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem (BRANDÃO et al., 2003; DALGLEISH, 2004; RODGERS et al., 1997).

Embora o estudo do comportamento animal não tenha como contribuir para o entendimento dos componentes subjetivos da ansiedade, ele permite identificar estruturas e vias envolvidas nos componentes avaliativos e expressivos dessa emoção, o que contribui para o entendimento das suas bases neurais (PRATT, 1992).

Nas últimas décadas, houve um avanço significativo na identificação das regiões encefálicas envolvidas na ansiedade graças aos estudos de estimulação elétrica ou química, e lesão de estruturas encefálicas em animais de experimentação, bem como aos estudos de neuroimagem funcional em humanos (PHILLIPS et al., 2003; SYLVERS et al., 2011).

Como se acredita que a ansiedade-traço e a ansiedade-estado apresentam substratos neurais distintos, então a descrição de cada um deles se dará de forma separada. No entanto, antes desta descrição, será apresentada uma seção sobre uma das técnicas de ablação experimental mais utilizada para a investigação de substratos neurais, a lesão excitotóxica (KIRBY et al., 2012).

2.1.3.1 LESÃO EXCITOTÓXICA

Lesão excitotóxica ou excitotoxicidade é o termo utilizado para se referir à morte neuronal causada por uma estimulação excessiva dos receptores de neurotransmissores excitatórios (OLNEY, 1969). Os primeiros pesquisadores a constatarem o efeito neurotóxico do glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso, foram Lucas e Newhouse (1957). Eles verificaram que a administração sistêmica de altas doses de glutamato em camundongos neonatos promovia uma destruição das camadas mais internas da retina. Posteriormente, Olney (1969) corroborou e expandiu os achados de Lucas e Newhouse, na medida em que mostrou que altas doses de glutamato administrado sistemicamente a camundongos neonatos além de provocar lesões retinianas também provocava lesões cerebrais disseminadas. Alguns anos mais tarde, Schwarcz e colaboradores (1983) administraram intracerebralmente ácido quinolínico, um agonista glutamatérgico, e constataram que o mesmo promovia lesões cerebrais localizadas. Esta descoberta propiciou o desenvolvimento da lesão excitotóxica experimental, uma ferramenta que muito tem contribuído para o campo da neurobiologia.

A lesão excitotóxica experimental é um método que consiste na administração intracerebral de doses de agonistas glutamatérgicos, que superativam os receptores de glutamato, promovendo a morte dos neurônios na região de administração da substância, sem destruir as fibras de passagem (KIRBY et al., 2012).

Embora o mecanismo da lesão excitotóxica ainda não esteja totalmente esclarecido, há uma gama de evidências sugerindo que o excesso de estimulação dos receptores glutamatérgicos produz uma série de efeitos que incluem: perturbação da homeostase do cálcio intracelular, comprometimento das funções das organelas citoplasmáticas, aumento da concentração de óxido nítrico e de radicais livres, ativação persistente de proteases e cinases e aumento na expressão de fatores de transcrição pró-morte (SATTLER; TYMIANSKI, 2001; WANG; QIN, 2010).

2.1.3.2 SUBSTRATO NEURAL DA ANSIEDADE-ESTADO

As raízes biológicas do estado ansioso residem nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representem uma ameaça à sobrevivência ou à integridade física

(GRAY; McNAUGHTON, 2000; PRATT, 1992). Esta relação pode ser ilustrada pelo trabalho desenvolvido pelo casal Robert e Caroline Blanchard, que analisaram o comportamento de ratos diante de predadores, classificando o tipo de estratégia de defesa adotada de acordo com o nível de ameaça (potencial, distal ou proximal) em que os animais se encontravam (GRAEFF, 2007; GRAEFF; HETEM, 2004).

De acordo com Blanchard e Blanchard (1988), se o nível de ameaça fosse distal ou proximal, os animais ou evitavam a situação sempre que existia uma rota de fuga disponível ou apresentavam um comportamento de congelamento (tornavam-se imóveis de forma tensa) quando não havia saída alguma, caracterizando assim um comportamento de medo. Já se o nível de ameaça fosse potencial, seja porque a situação era nova para o animal ou porque o mesmo já tinha se defrontado anteriormente com um perigo naquele local, os animais exibiam comportamento exploratório cauteloso permitindo uma avaliação de risco. Isto caracterizaria um comportamento de ansiedade.

Historicamente, os primeiros estudos que identificaram algumas estruturas encefálicas relacionadas à organização das respostas defensivas foram realizados pelo neurofisiologista suíço Robert Hess e seus seguidores. Eles demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial de gatos era capaz de desencadear reações de luta ou fuga, acompanhadas por manifestações neurovegetativas tais como, midríase, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial e piloereção. Verificaram ainda, que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal também desencadeava respostas de luta ou fuga, e que a estimulação da amígdala produzia uma reação de defesa afetiva retardada, perdurando após a cessação do estímulo. Este sistema composto pelo hipotálamo medial, a substância cinzenta periaquedutal dorsal e a amígdala ficou conhecido com Sistema Cerebral Aversivo (SCA), e é acionado por situações que desencadeiem respostas de medo incondicionado (BRANDÃO, 2008; GRAEFF; HETEM, 2004).

Situações de perigo potencial e estímulos associados à incerteza, novidade, punição e frustação são responsáveis por ativar um sistema neural conhecido como Sistema de Inibição Comportamental (SIC), postulado pelo psicólogo inglês Jeffrey Gray e publicado no seu livro intitulado *Neuropsychology of Anxiety* (1982). A ativação do SIC inibiria qualquer comportamento que estivesse sendo realizado pelo animal e aumentaria o nível de vigilância e de atenção. O SIC é composto pelo sistema septo-hipocampal, amígdala, núcleo mediano da

rafe, substância cinzenta periaquedutal ventral e *locus ceruleus* (BRANDÃO, 2008; GRAEFF; HETEM, 2004; GRAY; McNAUGHTON, 2000).

Influenciados pelo pensamento cognitivista, Gray e McNaughton publicaram a segunda edição do livro *Neuropsychology of Anxiety* (2000), na qual uma nova versão para o SIC, formulada em termos de processamento da informação, é apresentada. Nesta nova versão, o subículo, uma região hipocampal, agiria comparando as informações sensoriais, oriundas do córtex entorrinal, com as expectativas geradas pelo circuito de Papez (corpo mamilar do hipotálamo, tálamo ântero-ventral e córtex cingulado) que, por sua vez, integra informações oriundas do córtex pré-frontal, onde se dá o planejamento das ações. Se as informações recebidas são compatíveis com o esperado, então o sistema permanece no modo de "checagem" e o controle comportamental não é exercido pelo SIC. Por outro lado, quando há incompatibilidade entre as informações recebidas e o esperado, o SIC passa a operar no modo de "controle" gerando assim a inibição comportamental (ansiedade), acompanhada do aumento da atenção ao meio e do aumento da vigilância em direção aos estímulos potencialmente perigosos (BRANDÃO, 2008; GRAEFF; HETEM, 2004; GRAY; McNAUGHTON, 2000).

De acordo com essa visão de Gray e McNaughton (2000), o hipocampo seria a estrutura responsável pela avaliação do nível de ameaça enquanto que a amígdala seria responsável pelo aumento da excitação e da ativação autonômica frente a um estímulo ameaçador. Contudo, um grupo de pesquisadores liderados por Davis e LeDoux discorda desta proposição de Gray e McNaughton, pois acredita que é na amígdala e não no hipocampo que ocorre o processo de avaliação do nível de ameaça (BRANDÃO, 2008; DAVIS; WHALEN, 2001).

A amígdala, localizada no lobo temporal medial, é composta por pelo menos 13 núcleos distintos, sendo que os núcleos central, medial e basolateral são os mais claramente definidos (AMUNTS et al., 2005). Destes, tem sido demonstrado que os núcleos central e medial da amígdala se estendem rostral e medialmente, por meio de colunas de neurônios dispostas ao longo da estria terminal até o núcleo intersticial da estria terminal, localizado na porção posterior do estriado, e caudo-dorsalmente à substância inominata. Este *continuum* foi denominado de amígdala estendida (DAVIS et al., 2010; RIBAS, 2007; SAH et al., 2003).

Davis (1998) propõe que partes distintas da amígdala estendida podem estar envolvidas tanto nas respostas de medo quanto de ansiedade. O núcleo central da amígdala e o núcleo intersticial da estria terminal possuem alvos semelhantes no hipotálamo e no tronco encefálico, os quais estão intimamente relacionados a sinais e sintomas específicos da resposta de estresse. No entanto, estudos em roedores têm mostrado que o núcleo central da amígdala é ativado por sinais explícitos de ameaça, ao passo que, o núcleo intersticial da estria terminal é ativado por sinais abstratos, assim, o núcleo central da amígdala estaria relacionado ao medo e o núcleo intersticial da estria terminal à ansiedade (DAVIS et al., 2010).

Da amígdala estendida partem projeções eferentes: 1) para o núcleo lateral do hipotálamo, ativando o sistema nervoso simpático de forma que respostas galvânicas na pele, taquicardia, aumento da pressão arterial e dilatação das pupilas são observados; 2) para o núcleo paraventricular do hipotálamo, que através da secreção do hormônio liberador de corticotrofina estimula a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico que, entra na corrente sanguínea e estimula o córtex da adrenal a secretar glicocorticoides; 3) para o núcleo parabraquial, produzindo aumento no ritmo respiratório; 4) para a substância cinzenta periaquedutal dorsal, que organiza a resposta de defesa mediando comportamentos típicos da espécie; 5) para o *locus ceruleus*, promovendo aumento da vigilância; 6) para o núcleo motor dorsal do vago, que promove ativação parassimpática levando a alterações como micção, defecação e bradicardia; e, 7) para a área tegmental ventral, que pode mediar aumentos nos metabólitos da dopamina, induzidos por estresse, no córtex pré-frontal (DAVIS, 1992; DAVIS, 1998; DAVIS et al., 2010; WALKER et al., 2003).

2.1.3.3 SUBSTRATO NEURAL DA ANSIEDADE-TRAÇO

Diferentemente da ansiedade-estado que possui um substrato neural bem definido, como visto na seção anterior, pouco se conhece a respeito do substrato neural da ansiedade-traço.

Como 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), então é de se supor que o seu substrato neural deva residir em estruturas que controlem a avaliação cognitiva dos estímulos bem como a resposta

ansiosa a estes. Uma região encefálica que apresenta tanto a função de processamento cognitivo quanto a de modulação de respostas emocionais e que, portanto, é o alvo de investigação do substrato neural da ansiedade-traço, é o córtex pré-frontal (CPF - SIDDIQUI et al., 2008).

O CPF é uma região anterior do lobo frontal, que, no homem, pode ser dividido em três regiões: orbitofrontal (área 10 de Brodmann), dorsolateral (áreas 9 e 10 de Brodmann) e medial (área 24 de Brodmann – BONELLI; CUMMINGS, 2007; SIDDIQUI et al., 2008). A região medial é a que tem sido relacionada à ansiedade-traço (GORKA et al., 2014; SPAMPINATO et al., 2009). Em um estudo com voluntários saudáveis, Spampinato e colaboradores (2009) investigaram a relação entre espessura de áreas corticais e subcorticais e níveis de ansiedade-traço e, constataram que a espessura do córtex pré-frontal medial (CPFM) apresentava uma correlação inversa com os níveis de ansiedade-traço, de modo que indivíduos com alto traço ansioso apresentava menor espessura do CPFM e, indivíduos com baixo traço ansioso uma maior espessura. Já Gorka e colaboradores (2014), investigando se a relação entre autorrelato de maus-tratos sofridos na infância e a expressão de níveis aumentados de ansiedade-traço, na idade adulta, seria decorrente de modificações da morfologia córtico-límbica, constataram que indivíduos que relataram ter sofrido maus tratos na infância possuíam uma menor espessura do CPFM e esta, estaria relacionada ao aumento do nível de ansiedade-traço observado na idade adulta.

Além dessa alteração morfológica, estudos com roedores têm indicado que indivíduos com alto traço ansioso apresentam diferenças funcionais no CPFM em comparação a indivíduos de média ou baixa ansiedade-traço (ANDERZHANOVA et al., 2013; PRINSSEN et al., 2012). Prinssen e colaboradores (2012), investigando a atividade cerebral, por meio de ressonância magnética funcional, de duas linhagens de ratos, o Fisher 344 e o Sprague-Dawley, considerados com sendo de alta e de baixa emocionalidade, respectivamente, constataram que o Fisher 344 apresentava uma hiperatividade do CPFM em comparação ao Sprague-Dawley. Por sua vez, Anderzhanova e colaboradores (2013), estudando a neurotransmissão dopaminérgica em duas linhagens de camundongos consideradas de alta e de baixa emocionalidade, verificaram que camundongos de alta emocionalidade apresentavam uma maior concentração de dopamina no CPFM em comparação aos de baixa emocionalidade.

Os estudos supracitados apresentam evidências que sinalizam para um possível envolvimento do CPFM na ansiedade-traço, porém a confirmação deste envolvimento pode ser obtida por meio de estudos de ablação experimental, também denominados de estudos de lesão, que tem por finalidade investigar funções cerebrais, por meio da destruição de uma região do encéfalo e avaliação subsequente do comportamento do animal (CARLSON, 2013).

Dentre os animais, os que apresentam o CPFM mais próximo do humano e que, portanto, seriam os mais indicados para os estudos de lesão, são os primatas (SMAERS et al., 2011). Contudo, devido a limitações éticas tem-se evitado utilizar estes animais neste tipo de estudo. Uma alternativa que a comunidade científica encontrou e que tem funcionado é a utilização de roedores que, mesmo não possuindo essa região encefálica tão desenvolvida, guardam uma homologia da mesma com os primatas (UYLINGS et al., 2003; VERTES, 2006).

De acordo com critérios funcionais e hodológicos, o CPFM de roedores é formado por três regiões, a saber: córtex cingulado anterior, córtex pré-límbico e córtex infralímbico (CANTERAS et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2008). Estas regiões são interconectadas e também se conectam com outras estruturas corticais, diencefálicas e do tronco encefálico relacionadas com a resposta ansiosa como a amígdala, o hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo dorsal da rafe e a área tegmental ventral (CERQUEIRA et al. 2008; CONDÉ et al., 1995; JONES et al., 2005; VERTES, 2006).

2.1.4 NEUROTRANSMISSORES DA ANSIEDADE

Diversos neurotransmissores estão envolvidos nas bases biológicas da ansiedade. Dentre eles estão as aminas biogênicas (noradrenalina, serotonina e dopamina), aminoácidos (ácido gama-aminobutírico, glutamato e glicina), peptídeos (fator de liberação de corticotropina, hormônio adrenocorticotrópico, colecistocinina) e esteróides (cortisol, no ser humano, e corticosterona, nos animais). Aqui será dado destaque ao ácido gama-aminobutírico, a serotonina, a dopamina e ao glutamato. A abordagem dos dois primeiros deve-se ao fato de serem os neurotransmissores cujo papel tem sido mais investigado nos transtornos de ansiedade e na ação de medicamentos. Já a dos dois últimos deve-se a importância que exercem nos circuitos neurais em que o CPFM está envolvido.

2.1.4.1 ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO

O ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório, está presente em cerca de 40% de todos os neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC). É sintetizado a partir do glutamato em reação catalisada pela enzima ácido glutâmico descarboxilase, encontrada apenas em neurônios gabaérgicos. Muitos dos neurônios gabaérgicos são interneurônios que controlam a excitabilidade de circuitos locais, mas a grande maioria deles são neurônios de projeção (PETROFF, 2002). Acredita-se que os neurônios gabaérgicos sirvam como "rédeas" para o SNC, garantindo uma ação mais moderada do mesmo (OTTERSEN et al., 1995).

O papel do GABA na ansiedade foi proposto em consequência do estudo do mecanismo de ação dos benzodiazepínicos (BZD), ansiolíticos introduzidos na prática médica no início dos anos 60 (GRAEFF, 1997). A constatação de que os BZD diminuíam a ansiedade por intensificar a ação do GABA no SNC, levou os pesquisadores a concluírem que a ansiedade seria resultante de uma disfunção na neurotransmissão gabaérgica (HAEFELY et al., 1975). Estudos mostram que há uma correlação entre níveis aumentados de ansiedade e diminuição de receptores gabaérgicos em algumas regiões encefálicas (SKÓRZEWSKA et al., 2015; WISŁOWSKA-STANEK et al., 2013).

Três tipos de receptores gabaérgicos foram identificados: $GABA_A$, $GABA_B$ e $GABA_C$. Os receptores $GABA_A$ e $GABA_C$ estão diretamente ligados a canal de cloreto sendo, portanto, ionotrópicos. Já o receptor $GABA_B$ está acoplado, via proteína G, a canal de potássio, sendo, portanto, metabotrópico (ENZ, 2001). Dentre esses três receptores, o que está envolvida na ansiedade é o $GABA_A$.

O receptor $GABA_A$ é uma proteína heteropentamérica que pode ser composta pela combinação múltipla de oito subunidades: $\alpha_{1–6}$, $\beta_{1–4}$, $\gamma_{1–3}$, δ, ε, π, θ e ρ_{1-3}. Estas múltiplas combinações podem gerar diferentes subtipos de receptores $GABA_A$ resultando em uma diversidade de afinidade farmacológica por seus ligantes (PRITCHETT et al., 1989).

A maioria dos receptores $GABA_A$ no SNC é composta de duas subunidades α, duas β e uma γ (ANDERSSON; HALLDIN, 2013). A combinação destas subunidades determina as propriedades farmacológicas e fisiológicas dos subtipos de receptores. Em particular as subunidades α_2 e γ_2 têm sido implicadas no efeito ansiolítico dos BZD (MORRIS et al., 2006), cujo sítio de ligação se encontra na interface entre essas duas subunidades. Já o sítio de

ligação do GABA se encontra na interface entre as subunidades α e β (ANDERSSON; HALLDIN, 2013).

O GABA ao se ligar ao receptor $GABA_A$ promove a abertura dos canais de cloreto. Esta abertura resulta no aumento da condutância de cloreto da membrana, e, consequentemente, hiperpolarização da célula. Os BZD, por sua vez, se ligam ao receptor $GABA_A$ aumentado a afinidade desse receptor pelo GABA (SIEGHART; SPERK, 2002).

2.1.4.2 SEROTONINA

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano pela ação da enzima triptofano hidroxilase que converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano, o qual sofre descarboxilação pela ação da enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase formando assim a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT – CARLSON, 2013). Ela exerce um papel crucial na ansiedade, porém bastante complexo e pouco entendido. Os corpos celulares dos neurônios contendo 5-HT situam-se, majoritariamente, no mesencéfalo, ponte e bulbo nos chamados núcleos da rafe, daí eles projetam seus axônios para diversas regiões do encéfalo, por meio de duas vias serotonérgicas ascendentes: a ventral e a dorsal. A ventral origina-se dos núcleos mediano e dorsal da rafe, com predomínio do mediano, e, enquanto projeta-se para o hipotálamo posterior e corpos mamilares, envia algumas fibras para o núcleo interpeduncular, substância negra e tálamo, e outras que atravessam o fórnix em direção ao septo e ao hipocampo, as quais, acredita-se, serem especialmente importantes na inibição comportamental. Já a via serotonérgica ascendente dorsal origina-se principalmente no núcleo dorsal da rafe e distribui-se para a substância cinzenta periaquedutal, colículos superior e inferior e hipotálamo, onde se junta à via serotonérgica ventral. A partir daí suas fibras projetam-se para a amígdala e o neocórtex (GRAEFF, 1997; GRAEFF; HETEM, 2004; JACOBS; AZMITIA, 1992).

Os efeitos da 5-HT são mediados por uma família de pelo menos 13 subtipos de receptores: $5\text{-}HT_{1A, B, D, E, F}$, $5\text{-}HT_{2A, B, C}$, $5\text{-}HT_{3A}$, $5\text{-}HT_{3B}$, $5\text{-}HT_4$, $5\text{-}HT_6$, $5\text{-}HT_7$ (HANNON; HOYER, 2008). Destes subtipos, o $5\text{-}HT_{1A}$ e o $5\text{-}HT_7$ são os que têm sido mais estudados no campo da ansiedade (STIEDL et al., 2015).

O receptor 5-HT_{1A} está espalhado por todo SNC e pode ser pré-sináptico ou pós-sináptico. Ele é pré-sináptico nos corpos celulares e dendritos dos neurônios serotonérgicos dos núcleos mediano e dorsal da rafe, agindo, neste caso, como autorreceptor para regular a atividade serotonérgica (RIAD et al., 2000). Como receptor pós-sináptico, ele é encontrado principalmente no septo, hipocampo, amígdala e córtices entorrinal e cingulado anterior (HANNON; HOYER, 2008). Já o receptor 5-HT_7 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).

O interesse pela participação da 5-HT na ansiedade vem se intensificando com a descoberta de ansiolíticos não-BZD, que parecem atuar primariamente sobre a neurotransmissão serotonérgica (GRAEFF, 1997). Tem sido observado que o bloqueio de receptores serotonérgicos pós-sinápticos e, consequentemente, a diminuição da neurotransmissão serotonérgica produz efeito ansiolítico (BELL et al., 2014; KURHE; MAHESH, 2015). Contudo, há estudos mostrando que este mesmo efeito também é observado com o aumento da neurotransmissão serotonérgica (GUPTA et al., 2014; KASAHARA et al., 2015). Tais controvérsias devem-se ao papel dual que a 5-HT exerce na ansiedade (conhecida como teoria de Deakin e Graeff).

De acordo com esta teoria, os sinais de perigo estimulariam o sistema de defesa por meio da amígdala e ativariam neurônios serotonérgicos situados nos núcleos dorsais da rafe, os quais, por vias nervosas diferentes inervam a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal, facilitando a defesa na primeira e inibindo nesta última. Assim, em termos de emoções vivenciadas, sugere-se que a serotonina aumenta a ansiedade, atuando na amígdala, enquanto contém o pânico, agindo na substância cinzenta periaquedutal (GRAEFF, 1997). Neste sentido, considerando-se a complexidade do sistema serotonérgico, constituído de múltiplas vias e diferentes tipos de receptores, é pouco provável que se possa atribuir à 5-HT um papel unitário na ansiedade (BRAGA et al., 2010).

2.1.4.3 DOPAMINA

A dopamina, um neurotransmissor da família das catecolaminas, é sintetizada pela ação da enzima tirosina hidroxilase, que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA, e este ao ser descarboxilado forma a dopamina. Os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos

encontram-se na região mesencefálica, especificamente na substância negra e na área tegmental ventral, e no núcleo arqueado do hipotálamo. Da substância negra partem projeções axonais, principalmente, para o putâmen e o caudado, constituindo a via mesoestriatal ou nigroestriatal, relacionada à motricidade. Já da área tegmental ventral partem as projeções axonais para o núcleo accumbens, o hipocampo, o septo e a amígdala, formando a via mesolímbica, e para o córtex pré-frontal medial, formando a via mesocortical, ambas relacionadas a aspectos motivacionais, cognitivos e emocionais (OADES; HALLIDAY, 1987; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). Do núcleo arqueado partem projeções para a eminência mediana do hipotálamo médio-basal, formando a via tuberoinfudibular, relacionada ao controle da secreção de prolactina (GRATTAN et al., 2015). As vias mesolímbica e mesocortical apresentam um significativo grau de heterogeneidade quanto às suas origens anatômicas e os alvos de suas projeções. O córtex cingulado anterior, por exemplo, aparece como parte integrante tanto de uma via quanto de outra (GARDNER; ASHBY Jr, 2000).

Além das funções clássicas da dopamina, tem sido demonstrado que este neurotransmissor também desempenha um papel na ansiedade. Estudos têm mostrado que a exposição a estímulos aversivos aumenta a neurotransmissão dopaminérgica nas vias mesolímbica e mesocortical e este aumento induz respostas ansiosas (GÓMEZ et al., 2010; SIMON et al., 1993; TRAINOR, 2011). No entanto, o aumento observado em cada uma das vias parece ser dependente do tipo de estímulo aversivo. Bertolucci-D'Angio e colaboradores (1990) mostraram que a administração sistêmica de N-metil-β-carbonila-3-carboxamida, um agente ansiogênico, provocou o aumento dos níveis de dopamina no núcleo accumbens e em maior extensão no CPF, já a imobilização aumentou a dopamina no núcleo accumbens e em menor extensão no CPF, enquanto que o aperto da cauda gerou um aumento de dopamina apenas no núcleo accumbens. Esta ativação diferencial das vias mesolímbica e mesocortical pode ser atribuída à ativação de diferentes populações de células dopaminérgicas na área tegmental ventral em resposta a diferentes estímulos. Neste sentido, Brischoux e colaboradores (2009) tem mostrado que os neurônios dopaminérgicos da região ventral da área tegmental ventral são estimulados por estímulos aversivos ao passo que os neurônios da região dorsal são inibidos por este tipo de estimulação e estimulados por reforçadores, indicando assim a existência de dois grupos de neurônios funcionalmente distintos na área tegmental ventral. Este achado poderia explicar o papel da dopamina no processamento de eventos tanto gratificantes quanto aversivos (UNGLESS, 2004).

A presença de diferentes níveis de dopamina também tem sido relacionada a diferentes níveis de emocionalidade. Anderzhanova e colaboradores (2013) observaram que camundongos com alta emocionalidade possuem maiores níveis basais de dopamina no CPFM do que camundongos com baixa emocionalidade. Este achado também é observado em humanos. Mizuki e colaboradores (1992) mostraram que indivíduos com alta ansiedade-traço possuem maiores níveis de dopamina no CPF tanto em situações estressoras quanto no repouso em comparação com indivíduos com baixa ansiedade-traço.

Os efeitos da dopamina são mediados por cinco diferentes tipos de receptores, que são agrupados em duas famílias: D1 (D1 e D5) e D2 (D2, D3 e D4). Os receptores da família D1 são considerados excitatórios e estão acoplados a uma proteína G estimulatória. Já os receptores da família D2 estão acoplados a uma proteína G inibitória e, consequentemente, hiperpolarizam a célula, sendo considerados, portanto, inibitórios. Os receptores da família D1 estão localizados apenas pós-sinapticamente, enquanto que os receptores da família D2 podem estar localizados pré-sinapticamente, agindo como autorreceptor, ou pós-sinapticamente (CALLIER et al., 2003; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

Os receptores do tipo D1 e D2 estão presentes tanto nas regiões encefálicas de eferência dopaminérgica quanto nas de aferência, sendo que a proporção deles em cada uma destas regiões não está completamente esclarecida. O que se sabe é que na área tegmental ventral o predomínio é dos autorreceptores D2, que regulam a liberação de dopamina nas vias mesolímbica e mesocortical. No hipocampo, na amígdala, no septo e no CPF há a presença de ambos os tipos de receptores, sendo que também tem sido identificada nestas estruturas a presença do receptor D4, o qual se apresenta em maior concentração no CPF. Este receptor está localizado na membrana dos interneurônios gabaérgicos presentes nesta estrutura (MILLAN, 2003; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015) e, é por meio deste receptor bem como dos receptores do tipo D1 também presentes nestes neurônios que a dopamina exerce seus efeitos inibitórios e facilitatórios, respectivamente, na inibição gabaérgica de neurônios piramidais corticais (MILLAN, 2003; WANG et al., 2002).

2.1.4.4 GLUTAMATO

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, é sintetizado a partir da transaminação do α-cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs, ou por meio da hidrólise da glutamina, produzida e secretada pelas células da glia (KANDEL et al., 2014). Ele está presente em altas concentrações no encéfalo, porém apenas uma pequena parcela se encontra no meio extracelular, pois a grande maioria está localizada no interior das células, já que se ele for mantido em altas concentrações no meio extracelular pode levar a morte neuronal num processo denominado de excitotoxicidade (DANBOLT, 2001).

O controle das concentrações extracelulares de glutamato é realizado por transportadores de aminoácidos excitatórios (TAE) localizados na membrana plasmática de neurônios e de células da glia. Existem cinco tipos destes transportadores que são dependentes de sódio e estão localizados em locais específicos do sistema nervoso. Os tipos TAE1 e TAE2 são encontrados em células da glia, o TAE3 em neurônios, o TAE4 nas células de Purkinje do cerebelo e o TAE5 na retina (DANBOLT, 2001; FEATHERSTONE, 2010).

O glutamato exerce seu efeito por meio de dois diferentes tipos de receptores: os diretamente ligados a canal iônico (ionotrópicos) ou os acoplados a proteína G (metabotrópicos). Os receptores ionotrópicos são o N-metil-D-aspartato (NMDA), o α-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e o cainato, e medeiam uma neurotransmissão glutamatérgica rápida. Já os metabotrópicos estão reunidos em três grupos: grupo I (mGLU1 e mGLU5), grupo II (mGLU2 e mGLU3) e grupo III (mGLU4, mGLU6, mGLU7 e mGLU8), e medeiam uma neurotransmissão lenta. Estes tipos de receptores podem estar localizados pré ou pós-sinapticamente (RIAZA BERMUDO-SORIANO et al., 2012).

O sistema glutamatérgico exerce um importante papel na ansiedade. Regiões envolvidas com esta emoção como a amígdala, hipocampo, septo e CPFM 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 CPF (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997) bem como aumento da neurotransmissão glutamatérgica dos neurônios de saída da amígdala (BERGINK et al.,

2004). Intervenções com o intuito de diminuir esta neurotransmissão da amígdala, tais como administração de antagonistas glutamatérgicos dentro da própria estrutura ou diminuição da atividade dos neurônios glutamatérgicos que até ela chegam tem gerado um efeito ansiolítico (BERGINK et al., 2004; ZARRINDAST et al., 2012). Além disso, diversas drogas que agem em receptores glutamatérgicos ionotrópicos ou metabotrópicos com intuito de diminuir a neurotransmissão glutamatérgica geral têm apresentado efeito ansiolítico tanto em estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais de ansiedade, quanto em estudos clínicos, com pacientes com transtornos ansiosos (AMIEL; MATHEW, 2007; CARBOBREZ, 2003).

O glutamato também apresenta uma estreita relação com o GABA, o qual, conforme anteriormente mencionado, é sintetizado a partir dele. Além disso, em indivíduos saudáveis há uma perfeita harmonia entre a atividade excitatória e inibitória do SNC, a qual é perdida nos pacientes com transtornos ansiosos, os quais apresentam uma alta atividade glutamatérgica e uma baixa atividade gabaérgica (WIEROŃSKA et al., 2011).

2.2 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Modelos animais são preparações experimentais desenvolvidas numa espécie com o propósito de estudar um fenômeno que ocorre numa espécie diferente (MCKINNEY, 1984). Para ele ser válido é preciso que tenha a mesma estrutura do comportamento ou da patologia no ser humano, isto é, sempre que existir uma relação entre dois elementos no modelo animal, uma relação correspondente deve haver entre os mesmos elementos do comportamento humano (KAPLAN, 1973 *apud* BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

Os modelos animais têm sido utilizados para avaliar a ação de drogas no sistema nervoso central bem como auxiliar na compreensão das bases neurofisiológicas dos transtornos mentais. No entanto, eles sofrem limitações em virtude da subjetividade desses transtornos, já que se fundamentam na observação comportamental dos animais (ANDREATINI, 2002). Apesar desta limitação intransponível, os resultados experimentais com esses modelos têm contribuído de forma significativa para o desenvolvimento da neurociência e isso pode ser notado, por exemplo, em função do maior conhecimento da neurobiologia da depressão, a qual possui grande número de artigos publicados envolvendo modelos animais, em comparação à mania, que possui poucos (ANDREATINI et al., 2006), mesmo ambos os quadros coexistindo em pacientes com transtorno bipolar (AMERICAN

PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002; ANDREATINI, 2002). Assim, de acordo com Rodgers e colaboradores (1997), os modelos animais constituem a espinha dorsal da pesquisa pré-clínica em psicofarmacologia.

Para ser adequado, um modelo animal de comportamento deve preencher os critérios de validade preditiva (correlação farmacológica), validade de face (isomorfismo) e validade de construção (homologia e similaridade dos mecanismos neurobiológicos envolvidos; RODGERS et al., 1997). A validade preditiva refere-se ao conceito de que efeitos farmacológicos observados no âmbito clínico devem se comportar da mesma maneira quando utilizados no modelo animal (BELZUNG; GRIEBEL, 2001). Já a validade de face implica na similaridade fenotípica entre as expressões emocionais entre as espécies, exigindo que a resposta observada no modelo animal deva ser semelhante as respostas comportamentais e fisiológicas observadas em humanos. Por fim, a validade de construção relaciona-se ao raciocínio teórico desenvolvido para o modelo animal e o comportamento humano, devendo estes possuir fatores biológicos e comportamentos similares em relação à sua etiologia (BOURIN et al., 2007).

Em decorrência de a ansiedade ser um conceito que descreve um estado subjetivo, ela é considerada uma característica humana. Por isso, na melhor das hipóteses, ela pode ser apenas modelada e não reproduzida em animais (MARTIN, 1998). Assim, o emprego dos modelos animais de ansiedade justifica-se quando, partindo de perspectiva evolutiva, considera-se que a ansiedade humana esteja relacionada com reações de defesa que os animais apresentam em resposta a estímulos ou situações de perigo (GRAEFF, 1990).

Certamente os modelos animais são ferramentas muito úteis para o conhecimento da neurobiologia da ansiedade e, por conseguinte dos transtornos ansiosos, pois permitem estudar fenômenos que nem sempre podem ser investigados no ser humano, como por exemplo, as regiões encefálicas envolvidas nas disfunções comportamentais. Além disto, eles auxiliam na descoberta de novos tratamentos farmacológicos e/ou não-farmacológicos (VAN DER STAAY, 2006; STEIMER, 2011).

Existem vários modelos animais utilizados para medir objetivamente o comportamento ansioso. A maioria deles confrontam os animais com situações eliciadoras de ansiedade, são os chamados modelos animais de ansiedade-estado. Além destes, há os

chamados modelos animais de ansiedade-traço que são aqueles que não induzem repostas ansiosas.

2.2.1 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE-TRAÇO

A ansiedade-traço pode ser estudada em ratos e em camundongos através de: 1) modelos animais baseados na manipulação genética (BELZUNG; GRIEBEL, 2001); 2) modelos animais baseados na seleção genética (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; SYLVERS et al., 2011); e/ou, 3) modelos animais etologicamente fundamentados (GRIEBEL et al., 1993; TEIXEIRA-SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014).

A importância e as contribuições advindas do uso de modelos animais geneticamente modificados ou geneticamente selecionados para o estudo da neurobiologia do traço ansioso são indiscutíveis (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; CRYAN; SWEENEY, 2011). Contudo, nem todos os laboratórios de pesquisa dispõem de linhagens geneticamente modificadas para manifestar altos ou baixos níveis de ansiedade, ou de linhagens isogênicas que espontaneamente manifestam característica de alto ou baixo traço ansioso. Neste caso, uma opção muito útil é o processo de seleção de animais de linhagens heterogênicas de acordo com seus níveis de emocionalidade. Este processo de seleção se dá por meio do uso de modelos animais etologicamente fundamentados (GOES et al., 2013). Até o presente momento, o Paradigma da Exploração Livre é tido como o único modelo etológico que foi validado como sendo um modelo animal de ansiedade-traço (GRIEBEL et al., 1993; TEIXEIRA-SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; ALMEIDA-SOUZA et al., 2015).

2.2.1.1 PARADIGMA DA EXPLORAÇÃO LIVRE

O paradigma da exploração livre (PEL) consiste em dar a oportunidade aos animais de se movimentar livremente dentro de um ambiente contendo tanto partes familiares quanto partes novas. Esta abordagem permite uma avaliação de respostas neofóbicas. Como os animais têm uma escolha entre novidade e familiaridade, então, é esperado que os indivíduos com baixa ansiedade-traço exibam uma preferência pela novidade, enquanto os de alta ansiedade-traço, pela familiaridade. Este paradigma foi descrito, inicialmente, na década de 60 por Hughes (1965; 1968), que observou que ratos Wistar preferiam o ambiente novo,

permanecendo mais tempo nele. Alguns anos depois, Misslin e colaboradores (1982; 1986) observaram que camundongos Swiss, nesta situação, não apresentavam sinais fisiológicos de medo, a não ser que fossem forçados a entrar no ambiente novo, indicando que não há mudança do estado ansioso durante a realização do teste. Não obstante, Griebel e colaboradores (1993), comparando duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, consideradas com sendo de alta e de baixa emocionalidade, respectivamente, observaram que os camundongos BALB/c apresentavam uma forte preferência pelo ambiente familiar, enquanto os camundongos C57BL/6 preferiam o lado novo, indicando que o PEL poderia diferenciar traços de personalidade. Considerados como um todo, estes resultados indicam que o PEL avalia o traço e não o estado ansioso. Isto foi ainda mais evidenciado pelo fato de que Belzung e Le Pape (1994), usando análise fatorial, 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). Além disso, foi demonstrado, usando ratos (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009) e ratas Wistar (OLIVEIRA et al., 2014), que o PEL é estável ao longo do tempo, uma condição *sine qua non* para qualquer modelo que se propõe a medir ansiedade-traço, que, por definição, não varia de momento a momento (SPIELBERGER, 1972)

Além de validado comportamentalmente, o PEL também é capaz, tanto em ratos quanto em camundongos, de distinguir efeito ansiolítico e ansiogênico de drogas utilizadas na clínica, caracterizando assim sua validade farmacológica (ALMEIDA-SOUZA et al., 2015; BELZUNG; BERTON, 1997; GRIEBEL et al., 1993).

Os estudos com o PEL têm contribuído enormemente para o entendimento da psicobiologia da ansiedade-traço. Nestes estudos, ele tem sido utilizado para compreender o processo pelo qual ocorre a transmissão da reatividade emocional, de pais para filhos (CALATAYUD et al., 2004) e para avaliar a influência do enriquecimento ambiental, estabelecido no desmame, sobre os níveis de ansiedade-traço (CHAPILLON et al., 1999). Além disso, o PEL têm sido utilizado para avaliar a correlação entre ansiedade-traço e ansiedade-estado (GOES et al., 2009), verificar a relação entre ansiedade-traço e depressão (DUCOTTET & BELZUNG, 2005) bem como entre ansiedade-traço e dor orofacial (MATOS et al., 2011) e entre ansiedade-traço e hipertensão arterial (GARCEZ et al., 2014).

2.2.2 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE-ESTADO

Estima-se que existam mais de 30 modelos animais utilizados na investigação pré-clínica da ansiedade. Alguns são baseados em repostas fisiológicas e outros em estados induzidos por drogas, mas a grande maioria recorre a avaliações comportamentais. Os modelos baseados em métodos comportamentais são classificados em duas categorias: 1) testes de repostas incondicionadas; e, 2) testes de repostas condicionadas. Os modelos da primeira categoria possuem uma alta validade etológica, pois envolvem reações espontâneas ou naturais dos animais a estímulos aversivos que não implicam em dor ou desconforto elevado. Já os modelos da segunda categoria envolvem respostas condicionadas a estímulos estressantes e dolorosos, como choque elétrico e privação de água e comida (GRIEBEL, 1995; RODERGS et al., 1997; STEIMER, 2011).

Independentemente da categoria à qual pertençam, esses modelos expõem os animais a situações eliciadoras de ansiedade, modelando, assim, a ansiedade-estado (GOES et al., 2009). Os modelos animais de ansiedade-estado mais comumente utilizados são listados no quadro 2.

Quadro 2. Relação dos modelos animais de ansiedade-estado mais comuns.

Modelos baseados em respostas incondicionadas	**Modelos baseados em respostas condicionadas**
(1) Testes de exploração Labirinto em cruz elevado Placa perfurada Campo aberto Labirinto em T elevado Labirinto em zero elevado (2) Transição claro/escuro Caixa de transição claro/escuro (3) Testes sociais Teste de vocalizações ultrassônicas induzidas pela separação (filhotes) Teste de vocalizações ultrassônicas induzidas pelo estresse (adultos) Teste de interação social (3) Defesa anti-predatória Bateria de testes de ansiedade Teste de exposição ao odor do predador (4) Outros Teste de hiponeofagia Teste de hipertermia induzida pelo estresse	(1) Testes de conflito Geller-Seifter Vogel (2) Testes de esquiva Esquiva passiva Esquiva ativa Esquiva inibitória (3) Outros Teste de sobressalto potencializado pelo medo Teste de enterrar defensivo

Extraído de: STEIMER, 2011.

Existe uma grande diversidade de aplicações possíveis para o LCE. Investigações do efeito ansiolítico e ansiogênico de agentes farmacológicos, de drogas de abuso e de hormônios têm sido realizadas (DE MELLO SCHIER et al., 2014; MORRISON et al., 2015; ŠLAMBEROVÁ et al., 2015). Além disso, o LCE tem sido utilizado para investigar os efeitos da exposição a fatores estressantes no período pré ou pós-natal (GRUNDWALD; BRUNTON, 2015; VEY et al., 2015), bem como na investigação da influência do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade de ratos e camundongos (AHMADALIPOUR et al., 2015; AKILLIOGLU et al., 2015; GOES et al., 2015). Não obstante, vários trabalhos sobre áreas encefálicas (amígdala, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal, etc.) e neurotransmissores (GABA, glutamato, 5-HT, neuromoduladores do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais, etc.) envolvidos no comportamento subjacente a

ansiedade têm sido identificados com o auxílio do LCE (ARIZA TRASLAVIÑA et al., 2014; BATISTA et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; LIU et al., 2015; YEUNG et al., 2015).

2.2.2.2 PLACA PERFURADA

O teste da placa perfurada (PP) tem ganhado popularidade dentre os modelos animais de ansiedade, tanto por se tratar de um método simples para medir resposta de um animal frente a um estímulo aversivo, quanto por possibilitar a quantificação e observação de vários comportamentos nos roedores (TAKEDA et al., 1998). Ele foi originalmente idealizado para camundongos (BOISSIER; SIMON, 1962), mas uma versão modificada foi subsequentemente proposta para ratos (FILE, 1973).

O aparato da PP consiste numa arena quadrada com dezesseis buracos no chão. Os animais são colocados no aparato e é registrado o número de vezes que o animal mergulha a cabeça nos buracos bem como o tempo de permanência neste mergulho. Estes parâmetros são inversamente proporcionais ao estado ansioso e foram validados como medidas de ansiedade. Assim, drogas ansiolíticas aumentam o número e o tempo de mergulhos da cabeça, ao passo que drogas ansiogênicas diminuem estes parâmetros (CAMPOS et al., 2013, FILE; WARDILL, 1975; TAKEDA et al., 1998).

Trabalhos têm sido publicados utilizando a PP para investigar o efeito ansiolítico ou ansiogênico de drogas de abuso (MANZO et al., 2014), de extratos de plantas (IBIRONKE; UGEGE, 2014; SOLLOZO-DUPONT et al., 2015) e de outros agentes farmacológicos (AMIRI et al., 2015; KURHE; MAHESH, 2015). Ademais, a PP vem sendo empregada nos estudos que visam avaliar o mecanismo de ação de novas drogas ansiolíticas (HAN et al., 2011; LEE et al., 2013; NASEHI et al., 2013), bem como nos processos de investigação de regiões encefálicas envolvidas na manifestação desta emoção (ADAMEC et al., 2012; MEYZA et al., 2009).

2.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Entende-se por enriquecimento ambiental, no caso de animais de laboratório, como condições de alojamento, quer sejam gaiolas ou câmaras exploratórias, que proporcionem

maior estimulação sensorial, cognitiva e/ou motora em comparação com as das gaiolas padrão (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

O primeiro pesquisador, no contexto neurocientífico, a trabalhar com enriquecimento ambiental foi Donald Hebb, no final da década de 40. Ele comparou ratos que viviam livremente em sua casa com aqueles mantidos em gaiolas no laboratório e, constatou que os primeiros apresentavam melhor desempenho num teste de labirinto do que aqueles mantidos no laboratório. Como este experimento foi realizado com uma amostra pequena de animais e sem um controle preciso, alguns anos depois, Bernard Hymovitch, seu aluno de doutorado, repetiu esse experimento com uma amostra maior de animais e com um controle mais adequado. Hymovitch comparou animais mantidos em gaiolas padrão com animais mantidos em gaiolas maiores contendo túneis sem saída, pistas inclinadas e pequenas áreas fechadas. Ele observou que os animais mantidos nesta última condição apresentavam melhor desempenho num teste de labirinto do que aqueles mantidos em gaiola padrão, corroborando assim o achado de Hebb. Pouco tempo depois desta confirmação, os pesquisadores Donald Forgays e Janet Forgays, também alunos de Hebb, verificaram que animais mantidos em um ambiente maior que a gaiola padrão contendo diversos objetos apresentavam um melhor desempenho num teste de labirinto do que aqueles mantidos em um ambiente maior que a gaiola padrão e sem a presença de objetos, mostrando assim que o uso de objetos é importante para a obtenção dos efeitos benéficos do enriquecimento ambiental (FORGAYS; FORGAYS, 1952; HYMOVITCH, 1952; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

Já na década de 60, um grupo de pesquisadores da Universidade da Califórnia liderado por Mark Rosenzweig começou a fornecer as primeiras evidências científicas de que um enriquecimento ambiental poderia levar a alterações estruturais e químicas no encéfalo bem como melhorar a capacidade cognitiva dos animais (KRECH et al., 1960, ROSENZWEIG et al., 1962, ROSENZWEIG et al., 1978). A partir de então, vários trabalhos têm sido publicados utilizando o enriquecimento ambiental. Para se ter uma ideia do quantitativo destes trabalhos foi realizado um levantamento na *Web of Science*, por meio do Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, utilizando a expressão “environmental enrichment” num período compreendido entre 1962 e 2016 e foram encontrados 5224 artigos.

Para construir um ambiente enriquecido, os laboratórios de pesquisa têm utilizado diversos protocolos, que variam no tamanho da gaiola (desde gaiolas ligeiramente maiores

que a padrão até gaiolas muito maiores que a padrão), nos objetos (forma, textura e cor), no tempo de exposição (de três a treze semanas), na idade de exposição (ao nascimento, no desmame ou na idade adulta), no número de animais expostos em conjunto (de cinco a doze), entre outras variações (SIMPSON; KELLY, 2011). Não há um consenso em relação a qual protocolo de enriquecimento é o ideal para a obtenção de efeitos benéficos. O fato é que um aumento da complexidade e da novidade do ambiente juntamente com a atividade física propicia aos animais maiores níveis de estimulação (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

Os efeitos do enriquecimento ambiental foram extensivamente revisados nos trabalhos de Hannan (2014), Nithianantharajah e Hannan (2006), Sale e colaboradores (2009), Simpson e Kelly (2011) e Van Praag e colaboradores (2000). Nestes é possível constatar que a exposição de animais a um ambiente enriquecido elicia efeitos benéficos em modelos de depressão, memória, ansiedade, Parkinson, Alzheimer, Huntington, epilepsia, esquizofrenia, esclerose múltipla, autismo, dentre outros. Em vista destes achados, Reynolds e colaboradores (2010) sugerem que estudos translacionais podem ser delineados a fim de se desenvolver recursos terapêuticos com aplicabilidade na espécie humana. Ainda de acordo com estes autores, a terapia de integração sensorial, um tipo de terapia que utiliza elementos chaves do enriquecimento ambiental, como estimulações cognitivas, sensoriais e motoras, pode ser um meio útil de expor indivíduos com desordens de desenvolvimento neurológico a um ambiente enriquecido e, avaliar o efeito desta intervenção em humanos. Nesse sentido, Woo e colaboradores (2015) compararam crianças autistas que receberam uma terapia de integração sensorial com aquelas que não receberam e, constataram que a terapia de integração sensorial melhorou vários aspectos das crianças autistas, tais como desempenho cognitivo, reatividade sensorial, linguagem receptiva, dentre outros, demonstrando assim o uso do enriquecimento ambiental como uma terapia para o tratamento do autismo.

2.3.1 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E ANSIEDADE

Embora o efeito do enriquecimento ambiental na ansiedade não seja um consenso na literatura (AHMADALIPOUR et al., 2015; PAEZ-MARTINE et al., 2013; SILVA et al., 2011), a maioria dos estudos indica que este tipo de manipulação ambiental reduz os níveis de ansiedade.

Animais expostos a um ambiente enriquecido expressam um nível reduzido de medidas relacionadas à emocionalidade tais como defecação e "congelamento" (SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013; BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004), passam mais tempo e fazem mais entradas nos braços abertos do LCE (AHMADALIPOUR et al., 2015; AKILLIOGLU et al., 2015), fazem mais mergulhos da cabeça no teste da PP (MESA-GRESA et al., 2013), exploram mais a área central de um campo aberto (HUGHES; OTTO, 2013), passam mais tempo na zona clara durante um teste de transição claro/escuro (DURAIRAJ; KOILMANI, 2014) e apresentam menores níveis de corticosterona quando expostos a estímulos aversivos (RAVENELLE et al., 2013). Tudo isto sinaliza um efeito ansiolítico do enriquecimento ambiental, o qual parece ser de longa duração, uma vez que ele continua a ser observado mesmo quando os animais são avaliados cerca de dois meses depois de serem retirados dessa condição ambiental (MOSAFERI et al., 2015).

Além de reduzir as respostas ansiosas frente a um estímulo aversivo, o enriquecimento ambiental estabelecido no desmame também é capaz de reduzir a propensão do indivíduo à ansiedade (CHAPILLON et al., 1999).

Os mecanismos pelos quais o enriquecimento ambiental atua na ansiedade ainda não foram totalmente esclarecidos. Uma hipótese é que o enriquecimento ambiental exerça seu efeito ansiolítico por meio da modulação do eixo HPA. Tal modulação pode dar-se através de mecanismos relacionados à neurogênese hipocampal (SCHLOESSER et al., 2010), ou através da modulação da expressão dos receptores do hormônio liberador de corticotrofina na amígdala (SZTAINBERG et al., 2010). Baseados em estudos anteriores, que mostraram que a supressão da neurogênese hipocampal em animais adultos gera sintomas ansiosos (REVEST et al., 2009) e leva a um aumento da ativação do eixo HPA (SCHLOESSER et al., 2009), Schloesser e colaboradores (2010) mostraram que animais expostos ao enriquecimento ambiental apresentavam menores níveis de ansiedade e uma neurogênese hipocampal preservada em comparação aos animais mantidos em gaiolas padrão, de forma que o efeito ansiolítico do ambiente enriquecido, para esses autores, seria decorrente da modulação do eixo HPA via neurogênese hipocampal. Já para Sztainberg e colaboradores (2010), a diminuição dos níveis de ansiedade decorrentes da exposição a um enriquecimento ambiental é atribuída a uma diminuição na expressão dos receptores para o hormônio liberador de corticotrofina na amígdala.

Além dessa modulação do eixo HPA, estudos mais recentes têm mostrado que a exposição a um enriquecimento ambiental aumenta os níveis de GABA (CONNORS et al., 2015) e 5-HT (LEGER et al., 2014) no córtex pré-frontal, o que também poderia explicar o mecanismo pelo qual este tipo de manipulação ambiental reduz os níveis de ansiedade.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do enriquecimento ambiental e da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e ansiedade-estado de ratos Wistar adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar a possibilidade de se modificar os níveis de ansiedade-traço de ratos Wistar adultos expostos a um ambiente enriquecido;

2) Avaliar a possibilidade de se modificar os níveis de ansiedade-estado de ratos Wistar adultos expostos a um ambiente enriquecido;

3) Investigar o envolvimento do CPFM na predisposição do indivíduo à ansiedade (ansiedade-traço);

4) Estender a investigação da participação do CPFM na resposta ansiosa a um estímulo ameaçador (ansiedade-estado).

4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, adultos (10 semanas de idade), oriundos do minibiotério do Laboratório de Fisiologia do Comportamento da Universidade Federal de Sergipe (LAFICO da UFS). Eles foram mantidos em gaiolas (41 cm x 34 cm x 17,5 cm) com, no máximo, cinco animais, com livre acesso à água filtrada e a ração própria para roedores, no minibiotério de origem, com temperatura controlada entre 22 e 24ºC, ciclo claro/escuro de 12h e exaustão do ar.

4.2 Modelos animais de ansiedade

4.2.1 Paradigma da exploração livre – modelo animal de ansiedade-traço

O modelo foi configurado conforme descrito por Antunes e colaboradores (2011).

O aparato (fabricação artesanal, Aracaju-SE, Brasil; Figura 2) consistiu de uma caixa de madeira, dividida em duas partes, sendo que cada parte se subdividiu em três unidades exploratórias de 20 x 20 cm. As duas metades foram separadas por uma divisória removível, e o chão foi coberto por zeólitas (Zoocel Biotério®, Celta Brasil, Cotia-SP, Brasil). Aproximadamente 24h antes do teste, um animal foi 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, a divisória entre o ambiente familiar e o novo foi removida, e o animal foi observado por 15 minutos sob luz infravermelha (ALMEIDA-SOUZA et al., 2015; GRIEBEL et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA-SILVA et al., 2009).

Os parâmetros avaliados foram: distância total percorrida (DTP) e o tempo de permanência em cada compartimento, de modo que a porcentagem de tempo no lado novo (%TLN) foi calculada – um parâmetro considerado uma medida confiável de ansiedade-traço em ratos Wistar (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014). Estes parâmetros foram registrados através de um sistema computadorizado de rastreamento de animais – Anymaze© (Stoelting Co., 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 2. Aparato do paradigma da exploração livre. **A:** vista lateral do aparato. **B:** vista superior do aparato contendo um animal explorando o lado novo (lado direito). O lado esquerdo representa o lado familiar.
Fonte: arquivo pessoal.

4.2.2 Labirinto em cruz elevado – modelo animal de ansiedade-estado

O modelo foi configurado conforme descrito por Pellow e colaboradores (1985), exceto pela iluminação, em que se optou pela luz vermelha (CHAPILLON et al., 1999).

O aparato (fabricação artesanal, Aracaju-SE, Brasil; Figura 3) consistiu em um labirinto de madeira com dois braços fechados (50 x 10 x 50 cm) e dois braços abertos (50 x 10 cm). Os quatro braços eram arranjados em cruz, conectados 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. Cada animal foi colocado no centro do labirinto e podia explorar todo o aparato por 5 minutos.

Os parâmetros avaliados foram: distância total percorrida (DTP), porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) e porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA). 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 3. Aparato do labirinto em cruz elevado, contendo um animal explorando um dos braços abertos.
Fonte: arquivo pessoal.

4.2.3 Placa perfurada – modelo animal de ansiedade-estado

O modelo foi configurado conforme descrito por File e Wardill (1975), exceto para o registro dos parâmetros comportamentais, para o qual foi utilizado um sistema automatizado (MONTAGUD-ROMERO et al., 2014).

O aparato (fabricação artesanal, Aracaju-SE, Brasil; Figura 4) consistiu de 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. Abaixo destes orifícios havia fotocélulas que estavam conectadas a um sistema computadorizado e eram sensíveis ao mergulho da cabeça do animal. O aparato foi elevado do chão numa altura de 50 cm. Cada animal foi colocado em um dos cantos do aparato e podia explorá-lo por 5 minutos.

Os parâmetros avaliados foram: distância total percorrida (DTP), número de mergulhos (NM) e o tempo de mergulho (TM). 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.

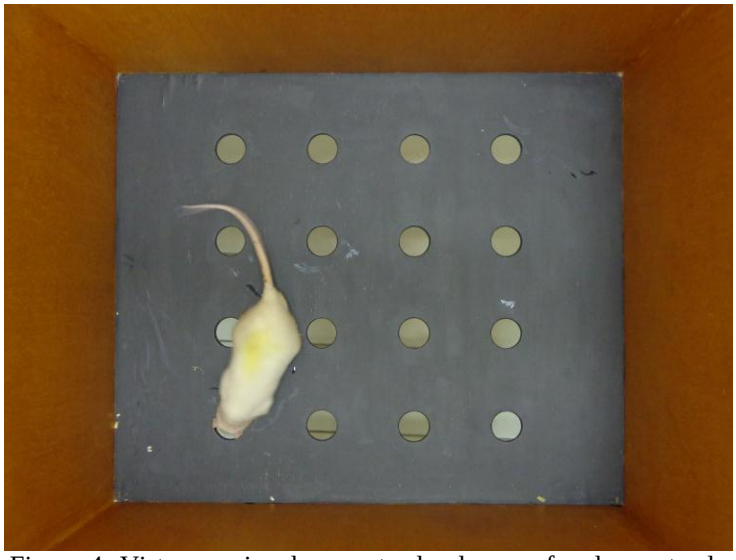

Figura 4. Vista superior do aparato da placa perfurada, contendo um animal mergulhando a cabeça em um dos buracos.
Fonte: arquivo pessoal.

4.3 Experimento I: Influência do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade-traço e -estado de ratos Wistar adultos

4.3.1 Enriquecimento ambiental

O ambiente enriquecido (Figura 5) consistiu de uma arena circular de polietileno (100 cm de diâmetro e 70 cm de altura), contendo diferentes objetos (túnel, escada, roda giratória, blocos e cubos de madeira e de plástico, de vários tamanhos e cores) e material para ninho, que foram trocados três vezes por semana. A cada troca, os animais recebiam uma barra de plástico, quatro blocos de madeira e três cubos de plástico de vários tamanhos e cores. Eles também recebiam material para ninho e um túnel, feito com tubos de PVC, interconectados de diversas formas. A roda giratória ficou disponível para os animais o tempo todo. O chão da arena foi coberto por maravalha e os animais tinham livre acesso à água e comida.

A arena foi mantida na mesma sala onde os animais estavam desde o nascimento. Somente cinco animais de cada vez foram colocados na arena para a permanência por quatro semanas.

Figura 5. Vista superior do ambiente enriquecido contendo cinco animais e diversos objetos (túnel, roda giratória, blocos e cubos de madeira e de plástico, de vários tamanhos e cores).
Fonte: arquivo pessoal

4.3.2 Procedimento (Figura 6)

Setenta animais foram primeiramente testados no PEL (PEL1). Os resultados da %TLN (Tabela 1) foram utilizados para categorizar os animais em alta (< 1º quartil), média (≥ 1º quartil e ≤ 3º quartil) ou baixa (> 3º quartil) ansiedade-traço. Três a seis dias após o PEL1, metade dos animais de cada categoria permaneceu em suas gaiolas (condição padrão: CP), enquanto a outra metade foi transferida para o ambiente enriquecido (condição enriquecida: CE). Após três semanas, todos os animais foram novamente testados no PEL (PEL2) e, em seguida, retornaram para seus respectivos ambientes. Este intervalo foi estabelecido para garantir a confiabilidade do PEL que é de quatro semanas para ratos Wistar (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009). Sete a dez dias após o PEL2, 50 dos 70 animais foram testados no LCE.

Os testes foram realizados na fase escura do ciclo claro/escuro, entre 19 e 20 horas.

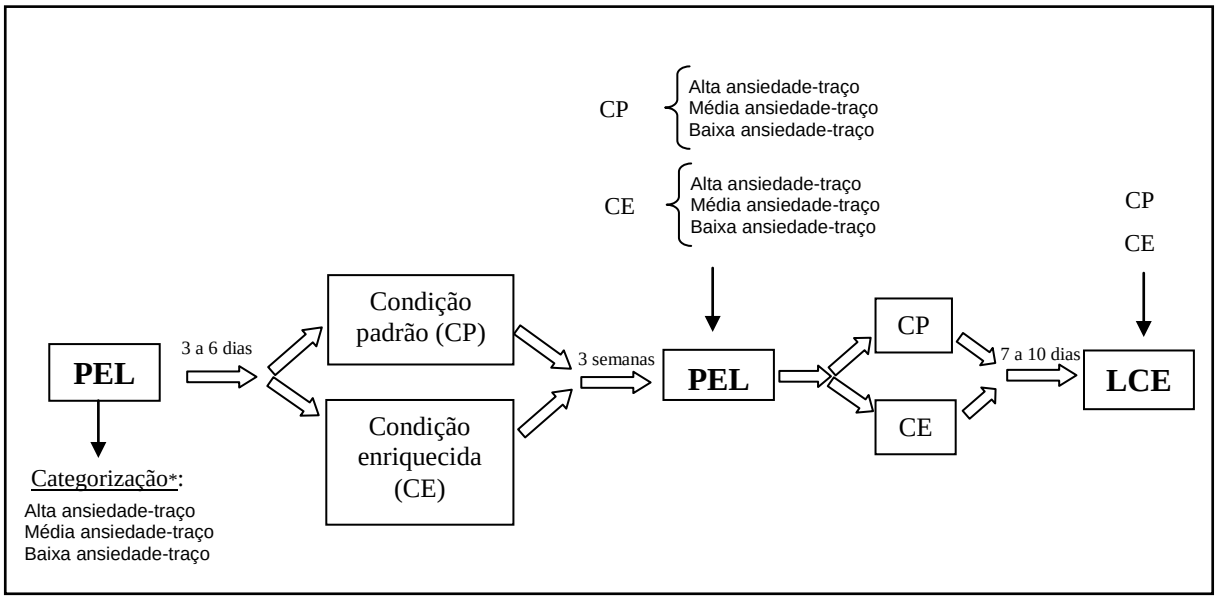

Figura 6. Desenho experimental do experimento I. PEL: paradigma da exploração livre; LCE: labirinto em cruz elevado. *Calculada com base nos valores do primeiro e do terceiro quartil do parâmetro porcentagem de tempo no lado novo (%TLN), assim animais com valores de %TLN menores que o primeiro quartil foram considerados de alta ansiedade-traço, com valores de %TLN maiores que o terceiro quartil de baixa ansiedade-traço e os demais como sendo de média ansiedade-traço.

4.3.3 Análise estatística

Os dados obtidos no PEL foram analisados por meio de ANOVA de três vias para medidas repetidas [fator 1: Ambiente (CP ou CE); fator 2: Nível de ansiedade (alta, média ou baixa); fator 3: Tempo (PEL1 ou PEL2)]. No caso de interação significativa dos três fatores, as análises seguiram-se com a fixação do fator Nível de ansiedade para a realização de ANOVA de duas vias para medidas repetidas nos outros dois fatores. Ainda no caso de interação significativa, as análises seguiram-se com a fixação do fator Ambiente para a realização de ANOVA de uma via para medidas repetidas no fator Tempo. Na ausência de interação significativa, os fatores foram analisados individualmente e teste *a posteriori* de Tukey foi realizado, quando apropriado.

A comparação entre os efeitos das duas condições ambientais no LCE foi realizada através de test t de Student, considerando-se todas as categorias juntas, já que um prévio estudo realizado no LAFICO da UFS mostrou não haver concordância entre o PEL e o LCE em relação aos níveis de ansiedade em ratos (GOES et al., 2009).

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

Um *z-score* foi calculado para todos os parâmetros e, animais apresentando valores fora do intervalo entre média ± dois desvios-padrão foram excluídos das análises. Após este cálculo, o tamanho da amostra para cada grupo foi apresentado nas Tabelas 1 e 2.

4.4 Experimento II: Avaliação do efeito da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e –estado de ratos Wistar.

4.4.1 Cirurgia estereotáxica

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 (Stoelting Co., Wood Dale-IL, EUA).

Com um bisturi foi feita uma 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 o CPFM: i) anteroposterior (AP): +3,0 mm, médio-lateral (ML): ±0,7 mm, dorsoventral (DV): -3,0 mm, ii) AP: +3,0 mm, ML: ±0,7 mm, DV: -4,0 mm e iii) AP: +4,0 mm, ML: ±0,7 mm, DV: -3,0 mm (LACROIX et al., 2000). Tomando-se como referência o bregma e a sutura sagital foram calculadas as coordenadas AP e ML, respectivamente. Após a localização destas coordenadas, o crânio foi perfurado, bilateralmente, com uma broca dentária e a linha média e a superfície do encéfalo foram expostas. A partir da linha média foram localizadas definitivamente as coordenadas ML. Isto foi necessário para minimizar erros de coordenadas decorrentes de variações anatômicas da sutura sagital. Já as coordenadas DV foram localizadas a partir da superfície do encéfalo. Subsequentemente, uma agulha 30 gauge foi introduzida no CPFM. A agulha estava conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microsseringa Hamilton de 10 µL cujo embolo foi impulsionado por uma bomba de microinfusão (Stoelting Co., Wood Dale-IL, EUA). Um volume de 0,2 µL de ácido quinolínico 0,09 M (Sigma–Aldrich, Brasil) dissolvido em tampão fosfato salina (TFS) 0,1 M pH 7,4 foi injetado em cada sítio. Após o término da infusão, foram aguardados três minutos antes da retirada da agulha para evitar refluxo. Ao final da cirurgia, a pele foi suturada e o animal, então, foi removido do aparelho estereotáxico e colocado individualmente numa gaiola, onde permaneceu até a sua completa recuperação. Neste período ele recebeu

administração do analgésico flunixina meglumina (1,1 mg/kg, s.c.) de 12/12 horas, durante dois dias, sendo que a primeira administração foi realizada imediatamente após a cirurgia. Estes animais constituíram o grupo Lesão.

Os animais que constituíram o grupo Falsa lesão (grupo controle) foram submetidos ao mesmo procedimento do grupo Lesão, mas foram infundidos com TFS 0,1 M pH 7,4 ao invés de ácido quinolínico.

4.4.2 Análise histológica

Os animais foram previamente anestesiados com ketamina (90 m/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Aproximadamente 50 mL de TFS 0,1 M pH 7,4 foram perfundidos transcardiacamente, seguidos de 300 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e mantidos em uma solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, os encéfalos foram fatiados em criostato com cortes com espessura de 40 μm, fixados em lâminas e corados com corante de Nissl para análise histológica (LACROIX et al., 2000).

A extensão da lesão, em cada animal, foi verificada por meio do atlas de Paxinos e Watson (1998), e a respectiva área foi calculada por meio do programa de processamento digital de imagens Image J (*National Institute of Health*, NIH, Estados Unidos). Os animais que não apresentaram lesão no CPFM foram excluídos das análises estatísticas.

Cabe aqui destacar que, a análise histológica foi realizada por um pesquisador que não tinha conhecimento dos resultados comportamentais.

4.4.3 Procedimento (Figura 7)

Sessenta e seis animais foram primeiramente testados no PEL (PEL1). Os resultados obtidos da %TLN foram utilizados para categorizar os animais em alta (%TLN < 51), média (51 ≤ %TLN ≤ 80) ou baixa (%TLN > 80) ansiedade-traço[2], de acordo com prévia categorização realizada no LAFICO da UFS (GOES et al., 2013). Três a seis dias após o

[2] Para a categorização dos animais do experimento II foram utilizados os valores do primeiro (51%) e terceiro (80%) quartis obtidos num prévio estudo realizado no LAFICO da UFS (GOES et al., 2013). Estes valores não foram utilizados para categorizar os animais do experimento I, pois quando este experimento foi realizado o prévio estudo ainda não tinha sido concluído.

PEL1, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, sendo que metade dos animais de cada categoria foi alocada no grupo Lesão e a outra metade no grupo Falsa lesão. Sete a nove dias após a cirurgia, todos os animais foram novamente testados no PEL (PEL2). Oito a dez dias após o PEL2 foram testados na PP.

As avaliações comportamentais na PP e no PEL foram, respectivamente, realizadas na fase clara (entre 14 e 16 horas) e escura (entre 19 e 20 horas) do ciclo claro/escuro.

O aparato do PEL foi limpo com uma solução de álcool etílico 10% após cada teste.

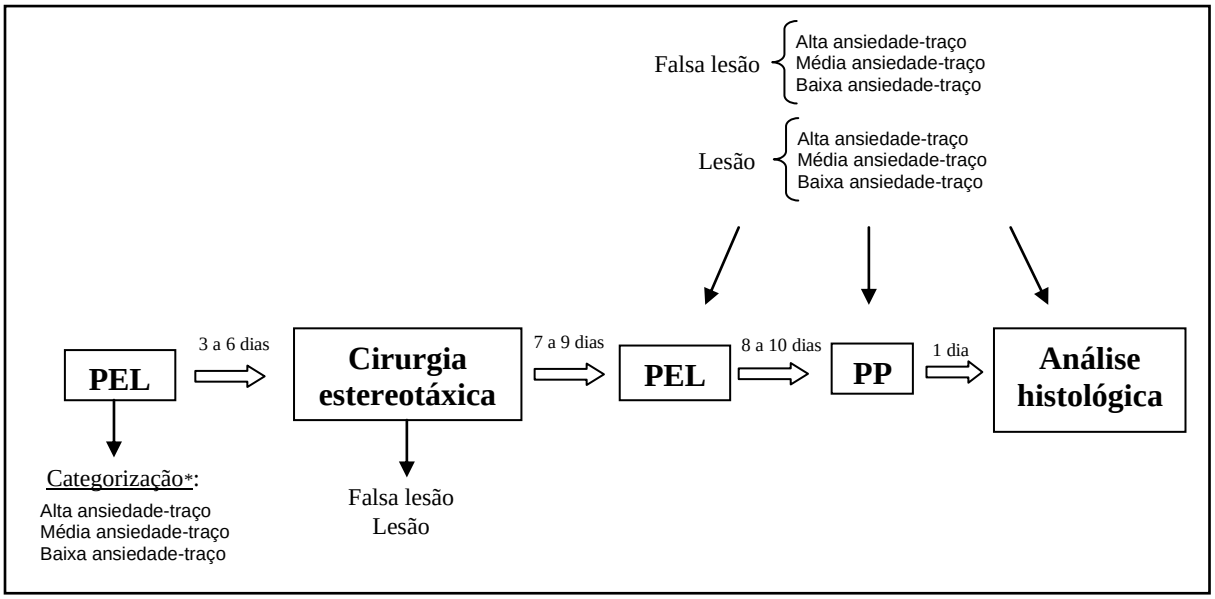

Figura 7. Desenho experimental do experimento II. PEL: paradigma da exploração livre; LCE: labirinto em cruz elevado; PP: placa perfurada. *Calculada com base em valores previamente estabelecidos e publicados (GOES et al., 2013), assim animais com porcentagem de tempo no lado novo (%TLN) inferior a 51% foram considerados de alta ansiedade-traço, com valores de %TLN maiores que 80% de baixa ansiedade-traço e os demais como sendo de média ansiedade-traço.

4.4.4 Análise estatística

Os dados da análise histológica foram analisados por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas [fator 1: Nível de ansiedade (alta, média ou baixa); fator 2: Secção (AP +4,20; AP +3,70; AP +3,20; AP +2,70; AP +2,20)]. No caso de interação significativa, as análises seguiram-se com a fixação do fator Nível de ansiedade para a realização de ANOVA de uma via para medidas repetidas no fator Secção. Na ausência de interação significativa, os fatores foram analisados individualmente e teste *a posteriori* de Tukey foi realizado, quando apropriado.

Os dados obtidos no PEL foram analisados por meio de ANOVA de três vias para medidas repetidas [fator 1: Tratamento (Lesão ou Falsa lesão); fator 2: Nível de ansiedade (alta, média ou baixa); fator 3: Tempo (PEL1 ou PEL2)]. No caso de interação significativa dos três fatores, as análises seguiram-se com a fixação do fator Nível de ansiedade para a realização de ANOVA de duas vias para medidas repetidas nos outros dois fatores. Ainda no caso de interação significativa, as análises seguiram-se com a fixação do fator Tratamento para a realização de ANOVA de uma via para medidas repetidas no fator Tempo. Na ausência de interação significativa, os fatores foram analisados individualmente e teste *a posteriori* de Tukey foi realizado, quando apropriado.

Os dados obtidos da PP foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas independentes [fator 1: Tratamento (Lesão ou Falsa lesão); fator 2: Nível de ansiedade (alta, média ou baixa)]. No caso de interação significativa entre o fator 1 e o fator 2 foi conduzido um teste *a posteriori* de Tukey para a interação. Na ausência de interação significativa, os fatores individuais foram analisados e teste *a posteriori* de Tukey foi realizado, quando apropriado.

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

O *z-score* foi calculado para todos os parâmetros e, animais apresentando valores fora do intervalo entre média ± dois desvios-padrão foram excluídos das análises. Após este cálculo, o tamanho da amostra para cada grupo foi apresentado nas Tabelas 3 e 4.

4.5 Ética

Ambos os experimentos respeitaram 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 e, pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal de Sergipe sob o protocolo CEPA 47/12.

Aqui, cabe destacar, que todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I: Influência do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade-traço e -estado de ratos Wistar adultos

5.1.1 Paradigma da exploração livre

5.1.1.1 Distância total percorrida (Tabela 1)

Não houve interação significativa dos fatores Nível de ansiedade, Ambiente e Tempo ($F_{2,58}$= 0,04; p= 0,96). Uma interação significativa foi observada apenas para os fatores Ambiente e Tempo ($F_{1,58}$= 6,60; p= 0,01). Fixando-se o fator Ambiente, a análise do Tempo como fator único mostrou que a CE reduziu a DTP no PEL2 em relação ao PEL1 ($F_{1,31}$= 17,31; p< 0,01), mas nenhuma diferença foi observada para a CP ($F_{1,31}$= 0,60; p= 0,44).

Tabela 1. Resultados do parâmetro DTP no PEL

Nível de ansiedade	Tipo de ambiente	DTP (m)	
		PEL1	PEL2
Alta (%TLN < 69,53)	CP (n = 9)	17,04 ± 1,76	17,33 ± 2,33
	CE (n = 8)	17,65 ± 1,90[a]	14,60 ± 1,59[b]
Média (69,53 < %TLN < 83,14)	CP (n = 14)	20,56 ± 1,18	19,67 ± 1,17
	CE (n = 16)	21,60 ± 1,24[a]	16,50 ± 0,74[b]
Baixa (%TLN > 83,14)	CP (n = 9)	20,51 ± 1,55	19,12 ± 1,20
	CE (n = 8)	23,58 ± 2,72[a]	17,86 ± 2,32[b]

PEL: paradigma da exploração livre; DTP: distância total percorrida; %TLN: porcentagem de tempo no lado novo; CP: condição padrão; PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre CE: condição enriquecida. Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator Nível de ansiedade não interagiu com os demais fatores (Ambiente e Tempo). a *vs* b: p < 0,01.
Dados representados por média ± e.p.m.

5.1.1.2 Porcentagem de tempo no lado novo (Figura 8)

A interação dos fatores Ambiente, Nível de ansiedade e Tempo foi significativa ($F_{2,58}$= 3,94; p= 0,02). Fixando-se o fator Nível de ansiedade, foi observada uma interação significativa dos fatores Ambiente e Tempo para os animais de alta ansiedade ($F_{1,15}$ = 8,42; p= 0,01). Fixando-se o fator Ambiente, a análise do Tempo como fator único mostrou que

os animais da CE passaram mais tempo no lado novo no PEL2 em comparação ao PEL1 ($F_{1,7}$= 19,51; p< 0,01), enquanto que nenhuma diferença foi observada para os animais da CP. Para as outras categorias de ansiedade, não foi observada interação significativa dos fatores Ambiente e Tempo, portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. O efeito do Ambiente não foi significativo em categoria alguma, enquanto que o efeito do Tempo foi significativo apenas para os animais de média ansiedade-traço ($F_{1,28}$= 8,45; p< 0,01), sendo que o tempo passado no lado novo foi maior no PEL2 do que no PEL1.

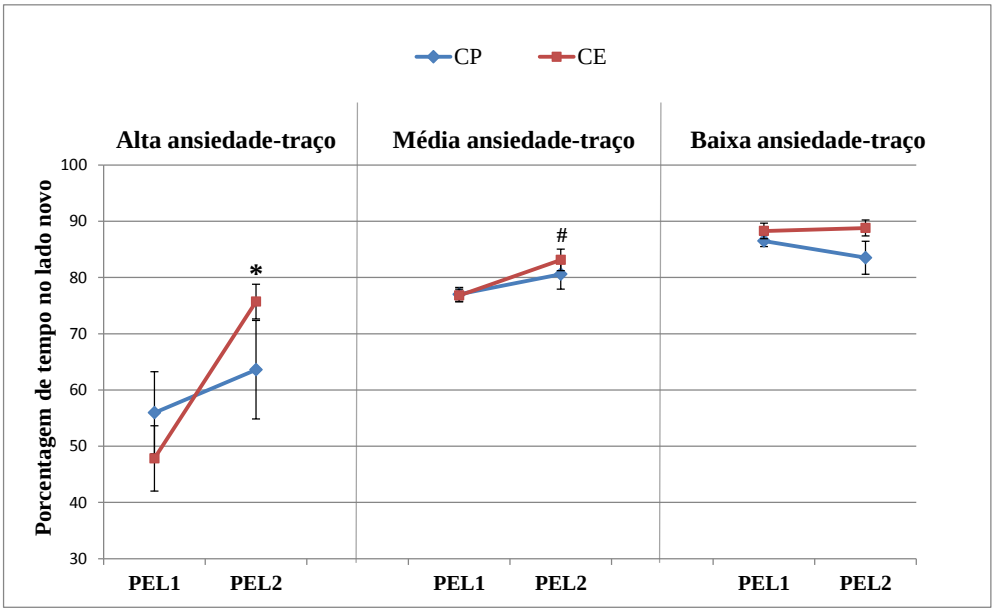

Figura 8. Interação dos fatores Ambiente (CP e CE), Nível de ansiedade (alta, média e baixa) e Tempo (PEL1 e PEL2). CP: condição padrão; CE: condição enriquecida; PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. *Diferença significativa em relação ao Tempo, somente para CE (p< 0,01). #Diferença significativa em relação ao Tempo (p< 0,01) sem efeito do Ambiente. Dados representados por média ± e.p.m.

5.1.2 Labirinto em cruz elevado

5.1.2.1 **Distância total percorrida** (Tabela 2)

Não houve diferenças significativas entre CP e CE (t= 1,03; p= 0,56).

5.1.2.2 **Porcentagem de tempo nos braços abertos** (Tabela 2)

Não houve diferenças significativas entre CP e CE (t= 0,58; p= 0,40).

5.1.2.3 Porcentagem de entrada nos braços abertos (Tabela 2)

Não houve diferenças significativas entre CP e CE (t= 0,88; p= 0,60).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros avaliados no LCE.

Tipo de ambiente	DTP (m)	%TBA	%EBA
CP (n= 22)	10,01 ± 0,39	9,74 ± 1,46	19,97 ± 2,56
CE (n= 22)	9,45 ± 0,45	8,42 ± 1,76	16,96 ± 2,29

LCE: labirinto em cruz elevado; DTP: distância total percorrida; %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos; %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos; CP: condição padrão; CE: condição enriquecida.
Dados representados por média ± e.p.m.

5.2 Experimento II: Avaliação do efeito da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e –estado de ratos Wistar

5.2.1 Resultado histológico

A lesão provocada pelo ácido quinolínico se concentrou nos córtices prelímbico, infralímbico e cingulado anterior, mas também atingiu, em pequena extensão, outras regiões como a área peduncular dorsal, a orbital medial, a ventral medial e a frontal 2 (figura 9). Fotomicrografias de secção coronal do CPFM são apresentadas na figura 10.

Dois animais de cada categoria de ansiedade foram excluídos da análise estatística, pois a extensão da lesão foi muito pequena e/ou não atingiu o CPFM em ambos os hemisférios cerebrais. Os seus respectivos controles também foram excluídos. Desta forma, o número de animais por grupo em cada categoria de ansiedade é apresentado nas tabelas 4 e 5.

A homogeneidade das lesões entre os grupos de alta, média e baixa ansiedade-traço foi verificada por meio de ANOVA (tabela 3), a qual revelou não haver interação significativa dos fatores Nível de ansiedade e Secção ($F_{8,88}$= 0,52; p= 0,83). Subsequentemente, os dois fatores foram analisados individualmente. Houve diferença

significativa entre as secções ($F_{4,88}$ = 6,71; p< 0,01), sendo que a área da lesão na secção coronal AP +4,20 mm foi menor do que nas demais secções (p< 0,01), mas não houve diferença entre os níveis de ansiedade ($F_{2,88}$= 0,01; p = 0,98).

Tabela 3. Resultados da área da lesão.

NÍVEL DE ANSIEDADE	SECÇÃO				
	AP +4,20 (mm^2)	**AP +3,70 (mm^2)**	**AP +3,20 (mm^2)**	**AP +2,70 (mm^2)**	**AP +2,20 (mm^2)**
Alta	$317,02 \pm 9,12^{a}$	$381,36 \pm 21,13^{b}$	$393,26 \pm 18,53^{c}$	$375,45 \pm 51,32^{d}$	$396,09 \pm 53, 25^{e}$
Média	$311,23 \pm 29,56^{a}$	$383,67 \pm 16,09^{b}$	$395,68 \pm 12,79^{c}$	$369,34 \pm 54,12^{d}$	$386,32 \pm 56, 45^{e}$
Baixa	$310,36 \pm 13,24^{a}$	$359,45 \pm 10,17^{b}$	$374,71 \pm 9,34^{c}$	$416,05 \pm 14,23^{d}$	$416,65 \pm 11,03^{e}$

AP: anteroposterior. Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator Nível de ansiedade não interagiu com o fator Secção. a *vs* b; a *vs* c; a *vs* d; a *vs* e: $p < 0,01$. Dados representados por média ± e.p.m.

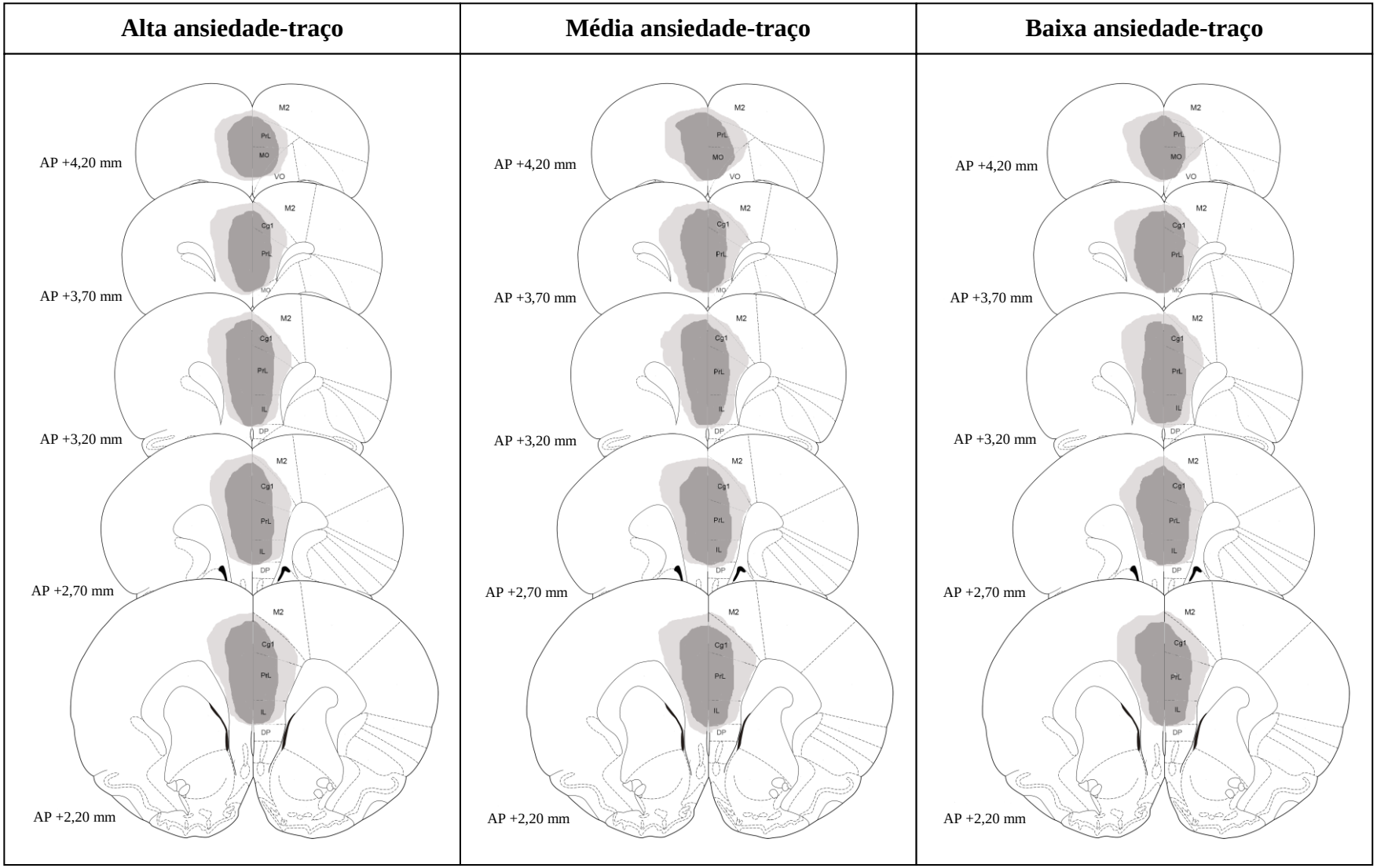

Figura 9. Diagrama esquemático de secções coronais do encéfalo de ratos ilustrando a extensão da lesão em cada nível de ansiedade-traço (alta, média e baixa) produzida pelo ácido quinolínico. A área em cinza claro representa a extensão máxima e, a área em cinza escuro representa a extensão mínima. Cg1, córtex cingulado anterior; DP, área dorsal peduncular; IL, córtex infralímbico; PrL, córtex prelímbico; M2, área frontal 2; MO, área medial orbital; VO, área ventral orbital. Modificado do atlas de Paxinos e Watson, 1998.

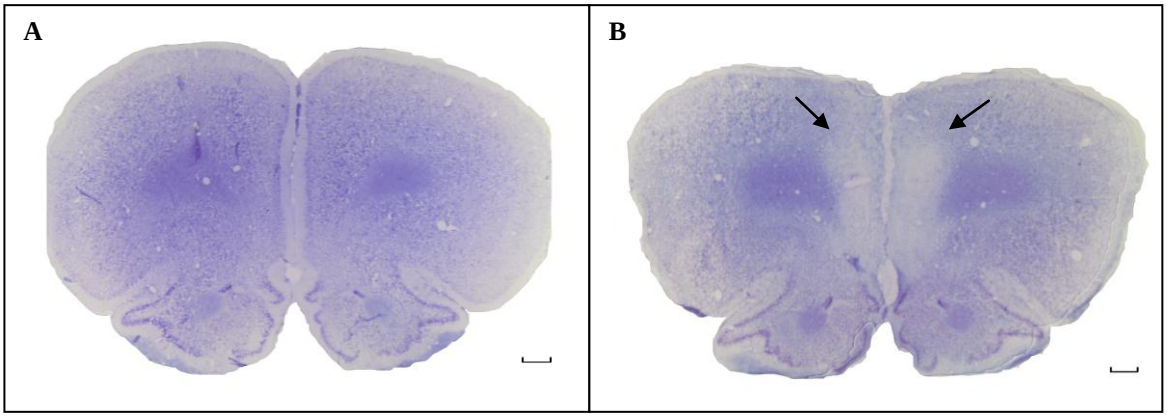

Figura 10. Fotomicrografias de secção coronal do CPFM tratadas pelo método de coloração de Nissl. (A) Falsa lesão; (B) Lesão. As setas indicam o local da lesão. A barra equivale a 0,5 mm

5.2.2 Paradigma da exploração livre

5.2.2.1 Distância total percorrida (Tabela 4)

Não houve interação significativa dos fatores Nível de ansiedade, Tratamento e Tempo ($F_{2,44}$= 2,03; p= 0,14). Uma interação significativa foi observada apenas para os fatores Tratamento e Tempo ($F_{1,44}$= 8,27; p< 0,01). Fixando-se o fator Tratamento, a análise do Tempo como fator único mostrou que a lesão aumentou a DTP no PEL2 em relação ao PEL1 ($F_{1,24}$= 10,99; p< 0,01), mas nenhuma diferença foi observada para o grupo Falsa lesão ($F_{1,24}$= 1,07; p= 0,31).

5.2.2.2 Porcentagem de tempo no lado novo (Figura 11)

A interação dos fatores Tratamento, Nível de ansiedade e Tempo foi significativa ($F_{2,44}$ = 3,95; p= 0,02). Fixando-se o fator Nível de ansiedade, foi observada uma interação significativa dos fatores Tratamento e Tempo para os animais de alta ansiedade ($F_{1,16}$ = 9,14; p < 0,01). Fixando-se o fator Tratamento, a análise do Tempo como fator único mostrou que os animais do grupo Lesão passaram mais tempo no lado novo no PEL2 em comparação ao PEL1 ($F_{1,8}$ = 28,60; p < 0,01), enquanto que nenhuma diferença foi

observada para os animais do grupo Lesão falsa ($F_{1,8} = 0,43$; $p = 0,53$). Para os animais de média ansiedade-traço, não foi observada interação significativa dos fatores Tratamento e Tempo ($F_{1,14} = 0,06$; $p = 0,81$); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. O efeito do Tempo foi significativo ($F_{1,14} = 13,15$; $p < 0,01$), sendo que o tempo passado no lado novo no PEL2 foi maior do que no PEL1. O efeito do Tratamento não foi significativo ($F_{1,14} = 0,64$; $p = 0,44$). Para os animais de baixa ansiedade-traço, não foi observada interação significativa dos fatores Tratamento e Tempo ($F_{1,14} = 0,24$; $p = 0,63$); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. O efeito do Tempo foi significativo ($F_{1,14} = 8,86$; $p = 0,01$), sendo que o tempo passado no lado novo no PEL2 foi menor do que no PEL1. O efeito do Tratamento não foi significativo ($F_{1,14} = 1,02$; $p = 0,33$).

Tabela 4. Resultados do parâmetro DTP no PEL.

Nível de ansiedade	Tratamento	DTP (m)	
		PEL1	PEL2
Alta	Falsa lesão (n = 9)	12,61 ± 2,50	12,37 ± 1,76
	Lesão (n = 9)	12,32 ± 1,83[a]	14,71 ± 1,87[b]
Média	Falsa lesão (n = 8)	18,68 ± 1,07	19,55 ± 1,59
	Lesão (n = 8)	18,84 ± 1,11[a]	20,73 ± 0,87[b]
Baixa	Falsa lesão (n = 8)	17,43 ± 1,49	13,59 ± 1,04
	Lesão (n = 8)	18,91 ± 1,67[a]	22,07 ± 2,74[b]

PEL: paradigma da exploração livre; DTP: distância total percorrida; PEL1: primeira passagem pelo paradigma da exploração livre; PEL2: segunda passagem pelo paradigma da exploração livre; Falsa lesão (grupo controle): animais submetidos à cirurgia estereotáxica sem lesão do córtex pré-frontal medial; Lesão: animais submetidos à cirurgia com lesão do córtex pré-frontal medial. Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator Nível de ansiedade não interagiu com os demais fatores (Tratamento e Tempo). a *vs* b: $p < 0,01$.
Dados representados por média ± e.p.m.

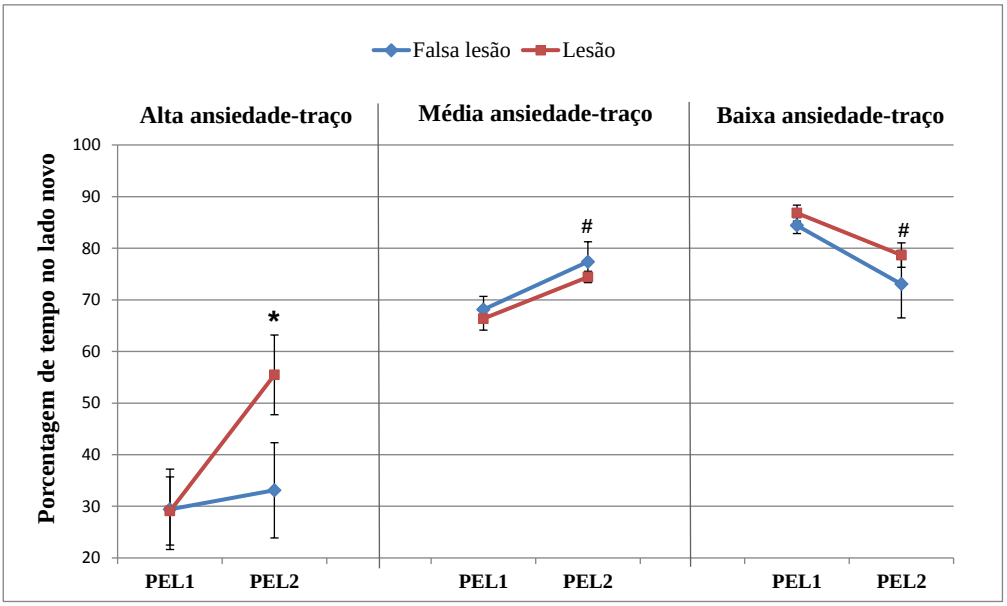

Figura 11. Interação dos fatores Tratamento (Falsa lesão e Lesão), Nível de ansiedade (alta, média e baixa) e Tempo (PEL1 e PEL2). PEL1: primeira passagem pelo paradigma da exploração livre; PEL2: segunda passagem pelo paradigma da exploração livre; Falsa lesão (grupo controle): animais submetidos à cirurgia sem lesão do córtex pré-frontal medial; Lesão: animais submetidos à cirurgia com lesão do córtex pré-frontal medial. *Diferença significativa em relação ao Tempo, somente para o grupo Lesão ($p < 0,01$). #Diferença significativa em relação ao Tempo ($p \leq 0,01$) sem efeito do Tratamento. Dados representados por média ± e.p.m.

5.2.3 Placa perfurada

5.2.3.1 **Distância total percorrida** (Tabela 5)

Não houve interação significativa dos fatores Tratamento e Nível de ansiedade ($F_{2,44} = 1,43$; $p = 0,25$); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. Nem o efeito do Tratamento ($F_{1,44} = 2,09$; $p = 0,15$), nem do Nível de ansiedade ($F_{2,44} = 0,23$; $p = 0,79$) foram significativos.

5.2.3.2 **Número de mergulhos** (Tabela 5)

Não houve interação significativa dos fatores Tratamento e Nível de ansiedade ($F_{2,44} = 0,82$; $p = 0,45$); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. O efeito do Tratamento foi significativo ($F_{1,44} = 23,42$; $p < 0,01$), sendo que o número de mergulhos do grupo Lesão foi maior que o do grupo Falsa lesão. O efeito do Nível de ansiedade não foi significativo ($F_{2,44} = 0,31$; $p = 0,73$).

5.2.3.3 Tempo de mergulho (Tabela 5)

Não houve interação significativa dos fatores Tratamento e Nível de ansiedade ($F_{2,44}$ = 0,21; p = 0,81); portanto, os dois fatores foram analisados individualmente. O efeito do Tratamento foi significativo ($F_{1,44}$ = 6,28; p = 0,01), sendo que o tempo de mergulho do grupo Lesão foi maior do que o grupo Falsa lesão. O efeito do Nível de ansiedade não foi significativo ($F_{2,44}$ = 0,64; p = 0,53).

Tabela 5. Resultados dos parâmetros avaliados na PP.

Tratamento	Nível de ansiedade	DTP (m)	NM	TM (s)
Falsa lesão	Alta (n=9)	6,23 ± 0,87	13,11 ± 1,59[a]	12,97 ± 2,19[c]
	Média (n=8)	4,18 ± 1,13	10,38 ± 1,59[a]	12,76 ± 2,68[c]
	Baixa (n=8)	7,49 ± 2,62	13,75 ± 2,15[a]	17,78 ± 4,39[c]
Lesão	Alta (n=9)	7,34 ± 1,07	19,11 ± 1,73[b]	19,94 ± 2,75[d]
	Média (n=8)	8,44 ± 1,16	19,63 ± 1,99[b]	21,74 ± 3,95[d]
	Baixa (n=8)	7,05 ± 0,83	18,75 ± 0,92[b]	22,35 ± 3,88[d]

PP: placa perfurada; DTP: distância total percorrida; NM: número de mergulhos; TM: tempo de mergulho; m: metros; s: segundos; Falsa lesão (grupo controle): animais submetidos à cirurgia sem lesão do córtex pré-frontal medial; Lesão: animais submetidos à cirurgia com lesão do córtex pré-frontal medial. Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator Nível de ansiedade não interagiu com o fator Tratamento. a *vs* b; c *vs* d: p < 0,01. Dados representados por média ± e.p.m.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do enriquecimento ambiental e da lesão do CPFM nos níveis de ansiedade-traço e ansiedade-estado de ratos Wistar adultos. O efeito do enriquecimento ambiental foi avaliado no experimento I e, o da lesão do CPFM no experimento II. Já que, por definição, 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), algo que afete a ansiedade-traço poderia hipoteticamente também afetar a ansiedade-estado e, por isso, esta também foi avaliada nos dois experimentos.

Os resultados do experimento I mostraram que a exposição ao ambiente enriquecido diminuiu os níveis de ansiedade-traço de ratos com alto traço ansioso. A influência do enriquecimento ambiental na ansiedade-traço já havia sido demonstrada em animais mantidos nesta condição ambiental desde o desmame (CHAPILLON et al., 1999), contudo nunca havia sido investigada em animais expostos a este tipo de ambiente quando adultos. O resultado do presente estudo mostra que o enriquecimento ambiental é capaz de modificar um perfil ansioso até mesmo quando introduzido na idade adulta. Aqui cabe considerar que os animais expostos ao ambiente enriquecido tiveram mais oportunidades de se moverem do que os animais mantidos em gaiolas padrão, o que poderia justificar o efeito ansiolítico aqui observado. De fato, tem sido demonstrado que a atividade física pode diminuir a ansiedade (DUMAN et al., 2008; SALAM et al., 2009), porém, o efeito oposto também já foi reportado (FUSS et al., 2010). Duman e colaboradores (2008) mostraram que camundongos com livre acesso a roda de atividades, num período de 3 a 4 semanas, apresentaram menores níveis de ansiedade em comparação àqueles que não a receberam. O mesmo resultado também foi observado por Salam e colaboradores (2009) ao compararem camundongos com livre acesso a roda de atividades, por duas semanas, com aqueles com livre acesso a uma roda de atividades travada. Por outro lado, Fuss e colaboradores (2010), utilizando a mesma linhagem de camundongos e o mesmo tempo de exposição a roda de atividades do estudo de Duman e, o mesmo grupo controle do estudo de Salam, observaram um resultado oposto, mesmo os animais apresentando uma média de atividade física diária semelhante à dos estudos anteriores. De qualquer modo, um estudo comparando dois tipos de ambientes enriquecidos, com e sem roda de atividade física, mostrou que o efeito ansiolítico do ambiente enriquecido não foi devido ao efeito da atividade física *per se* (HENDRIKSEN et al., 2010). Portanto, parece razoável acreditar que o efeito ansiolítico do enriquecimento ambiental observado aqui não foi devido simplesmente à atividade física.

Independentemente do tipo de ambiente, ratos de média ansiedade-traço apresentaram uma aparente redução da ansiedade na segunda exposição ao PEL. Este resultado contrasta com o de um estudo anterior (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009), em que foi demonstrado que não há diferenças significativas entre a primeira e a segunda exposição ao PEL para o parâmetro %TLN, quando os animais são retestados quatro semanas após a primeira exposição. Contudo, diferentemente do presente estudo, a análise dos resultados não levou em consideração as diferentes categorias de ansiedade. Assim, é possível que os animais com diferentes níveis de ansiedade-traço apresentem diferentes repostas a uma prévia "experiência fora da gaiola", de forma que os diferentes efeitos anular-se-iam mutuamente na análise conjunta dos resultados, explicando a aparente discordância entre os estudos.

Quanto à avaliação da ansiedade-estado no experimento I, optou-se pela utilização do LCE por se tratar de um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados em todo mundo. O teste do LCE foi inicialmente executado com o aparato iluminado por uma luz branca, conforme proposto por Pellow e colaboradores (1985). Contudo, durante a avaliação dos primeiros 20 animais, foi observado que os ratos da CE não estavam explorando o aparato, escolhendo um dos cantos dos braços fechados e nele permanecendo parados por praticamente todo o tempo. Esta observação levou-nos a levantar a hipótese de que os ratos da CE tivessem desenvolvido uma fotossensibilidade, já que ao contrário dos animais da CP, tinham a oportunidade de, durante o dia, ficarem dentro de túneis opacos, escondendo-se da luminosidade. Para solucionar este problema, o teste do LCE passou a ser realizado sob luz vermelha ao invés de luz branca. Embora tal procedimento exclua um dos fundamentos deste modelo, que é a aversão a espaços iluminados (PELLOW et al., 1985), ele não está plenamente em desacordo com a literatura (CHAPILLON et al., 1999; ZHU et al., 2006), além de não alterar a preferência dos animais pelos braços fechados. Desta forma, foi possível realizar uma avaliação mais fidedigna do comportamento dos animais.

Os resultados dos parâmetros avaliados no LCE mostraram que o enriquecimento ambiental estabelecido na idade adulta não foi capaz de influenciar a ansiedade-estado avaliada neste modelo animal. Esta discrepância entre os resultados do PEL e do LCE não foi completamente inesperada. Embora se acredite que indivíduos que apresentem alto traço ansioso experimentem reações de ansiedade-estado em maior intensidade e frequência do que os indivíduos com baixa ansiedade-traço (SPIELBERGER et al., 1972), já foi demonstrado que, pelo menos em modelos animais, esta correlação não é necessariamente verdadeira

(BELZUNG; LE PAPE, 1994; GOES et al., 2009). Em contrapartida, um recente estudo (SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013) demonstrou que ratos adultos mantidos num ambiente enriquecido por oito semanas apresentaram menores níveis de ansiedade no teste do Labirinto em Zero Elevado (LZE), quando comparados a animais mantidos em gaiolas padrão. O LZE é um modelo animal derivado do LCE e muito semelhante a este em termos de detecção de efeito ansiolítico e/ou ansiogênico de drogas em ratos (BRAUN et al., 2011). Assim, é possível que quatro semanas de exposição ao ambiente enriquecido, utilizada no presente estudo, não tenham sido suficientes para influenciar a ansiedade-estado avaliada no LCE. Não obstante, é importante ressaltar que os resultados dos estudos que avaliaram o efeito do enriquecimento ambiental no LCE são controversos, até mesmo quando o enriquecimento ambiental é iniciado logo após o nascimento ou o desmame. Os efeitos observados variam de ansiolítico a ansiogênico, em diferentes linhagens de camundongos e com diferentes tipos enriquecimento e duração de exposição. Por exemplo, Zhu e colaboradores (2006) observaram que um ambiente enriquecido composto por uma gaiola, um pouco maior que a padrão, contendo diversos objetos (túneis, esconderijos e rodas de atividade), trocados duas vezes por semana, apresentava efeito ansiogênico. Já Chapillon e colaboradores (1999), utilizando um ambiente enriquecido composto de três ou quatro gaiolas unidas por túneis, com diversos objetos (rodas de atividade e peças de plástico) trocados três vezes por semana, observaram uma diminuição da ansiedade nos animais. Menores níveis de ansiedade também foram observados em outros trabalhos que expuseram os animais a um enriquecimento ambiental por seis (BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004) ou oito semanas (CHAPILLON et al., 1999). No entanto, um trabalho de Õkva e colaboradores (2013), utilizando duas linhagens de camundongos, uma considerada mais emocional (BALB/c) e outra menos emocional (C57BL/6), demonstraram que, independentemente do tempo de exposição, o ambiente enriquecido diminuiu os níveis de ansiedade apenas dos camundongos da linhagem C57BL/6. Portanto, futuros estudos devem ser delineados para melhor compreender o efeito do enriquecimento ambiental na ansiedade avaliada no LCE.

De uma forma ou de outra, o presente protocolo experimental mostrou que o ambiente enriquecido, estabelecido na idade adulta, foi capaz de influenciar a ansiedade avaliada pelo PEL, sugerindo que este modelo seja mais sensível às influências do enriquecimento ambiental que o LCE. É possível também que o protocolo do ambiente enriquecido aqui estabelecido tenha promovido alterações neuroquímicas e neuroanatômicas em determinadas estruturas encefálicas envolvidas na predisposição à ansiedade de indivíduos altamente

ansiosos e que não estejam envolvidas na resposta ansiosa eliciada pelo LCE. Como pouco se conhece a respeito do substrato neural da ansiedade-traço, então torna-se mais difícil especular esta possibilidade. Foi pensando na carência de dados a respeito do substrato neural da ansiedade-traço que, então, o experimento II foi realizado.

Neste experimento, assim como no primeiro, os níveis de ansiedade-estado também foram avaliados, mas por meio do teste da PP. A mudança de modelo animal deu-se em virtude de ter sido constatado, em um prévio estudo realizado no LAFICO da UFS, que dentre três modelos animais de ansiedade-estado (caixa de transição claro/escuro, campo aberto e PP), a PP foi o que melhor se correlacionou com o PEL, ainda que esta correlação tenha sido fraca (dados não publicados). Desta forma, com o uso da PP seria mais fácil verificar se um efeito na ansiedade-traço poderia resultar num efeito na ansiedade-estado na mesma direção.

Os resultados do experimento II mostraram que a lesão do CPFM diminuiu a predisposição à ansiedade de ratos altamente ansiosos, bem como reduziu a resposta ansiosa destes animais frente a uma situação ameaçadora, indicando um envolvimento do CPFM na ansiedade-traço e, sugerindo que o seu efeito na ansiedade-estado seria consequência do seu envolvimento no traço ansioso. Por outro lado, a mesma lesão não afetou o perfil ansioso de ratos de média e de baixa ansiedade-traço, embora tenha diminuído os níveis de ansiedade-estado destes animais. Uma possível explicação para estes resultados seria uma diferença de sensibilidade entre os dois modelos animais de ansiedade aqui utilizados, de forma que a PP seria mais sensível do que o PEL. Como a PP é um modelo que induz respostas ansiosas, por confrontar os animais com situações eliciadoras de ansiedade, uma redução ou uma prevenção no aumento dos níveis ansiosos de todas as categorias de ansiedade seriam mais facilmente observadas neste modelo do que no PEL. Este, por não provocar uma resposta ansiosa, torna a observação da diminuição dos níveis basais de ansiedade mais difícil para os animais com baixo traço ansioso, em virtude de um efeito chão, ou seja, em virtude de os níveis de ansiedade basal destes animais já serem os mais baixos possíveis (GRIEBEL et al., 1993). Além disto, é sabido, de estudos em humanos, que um efeito ansiolítico é mais evidente em uma população ansiosa do que em voluntários normais, que aqui corresponderiam aos ratos de alta e média ansiedade-traço, respectivamente. Portanto, é possível que a lesão do CPFM tenha tido um efeito sobre todos os níveis de ansiedade-traço, mas que tenha sido observável somente nos animais altamente ansiosos expostos ao PEL.

Outra possível explicação dos resultados do experimento II é que a lesão do CPFM afetou tanto a ansiedade-traço quanto a ansiedade-estado, porém de forma independente. Como o CPFM não é uma estrutura anatomicamente homogênea, já que é composta por três sub-regiões: o córtex cingulado anterior, o córtex prelímbico e o córtex infralímbico (CANTERAS et al. 2009; CERQUEIRA et al. 2008; DALLEY et al. 2004), que apresentam diferentes padrões de laminação (PALOMERO-GALLAGHER; ZILLES, 2004) e, estão conectadas com diferentes estruturas corticais e subcorticais (CERQUEIRA et al. 2008; CONDÉ et al., 1995; JONES et al., 2005; MCDONALD et al., 1996), é possível que as diferentes sub-regiões do CPFM exerçam diferentes papéis funcionais, sendo que uma sub-região poderia estar envolvida na predisposição à ansiedade, enquanto outra sub-região poderia estar envolvida na resposta ansiosa a um estímulo ameaçador. De fato, estudos têm demonstrado uma relação entre alta ansiedade-traço e atividade do córtex cingulado anterior (PRINSSEN et al., 2012; MODI et al., 2014) e entre ansiedade-estado e atividade dos córtices prelímbico e infralímbico (MAASWINKEL et al., 1996, RESSTEL et al., 2008; STERN et al., 2010). Prinssen e colaboradores (2012) mostraram que ratos altamente ansiosos apresentam uma hiperatividade do córtex cingulado anterior em comparação aos ratos de média ansiedade-traço. Da mesma forma, Modi e colaboradores (2014) observaram que voluntários com alta ansiedade-traço apresentam maior excitação do córtex cingulado anterior quando comparados a voluntários com baixa ansiedade-traço. Por sua vez, Maaswinkel e colaboradores (1996) e Stern e colaboradores (2010) verificaram que lesão do córtex prelímbico diminui a resposta ansiosa frente a uma situação ameaçadora. Este mesmo resultado também foi observado por Resstel e colaboradores (2008) por meio da inibição do córtex infralímbico.

À luz destes achados, os resultados do experimento II parecem menos intrigantes. O efeito da lesão do CPFM na ansiedade-traço foi provavelmente devido à lesão do córtex cingulado anterior, que é hiperativo nos indivíduos altamente ansiosos, enquanto o efeito na ansiedade-estado foi provavelmente devido à perda funcional dos córtices prelímbico e infralímbico em todos os animais lesionados.

De posse destes resultados, é tentador especular que o efeito aqui observado do enriquecimento ambiental tenha sido devido a alterações neuroanatômicas e/ou neuroquímicas no córtex cingulado anterior, tais como aumento do número de dendritos e de novas sinapses, bem como aumento da atividade de neurônios gabaérgicos e serotoninérgicos, ou ainda,

diminuição da atividade de neurônios glutamatérgicos. É possível também que, dentro do CPFM, somente o córtex cingulado anterior tenha sofrido as alterações promovidas pela exposição ao ambiente enriquecido, já que esta exposição diminuiu apenas os níveis de ansiedade-traço dos ratos altamente ansiosos e, um prévio estudo demonstrou que os níveis diminuídos de ansiedade-estado apresentados por animais submetidos a um enriquecimento ambiental estão relacionados a uma menor atividade do córtex infralímbico (SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013). Portanto, futuros estudos poderiam ser delineados para melhor investigar estas especulações.

Ainda de acordo com os resultados do experimento II, independentemente do tratamento, ratos com média ansiedade-traço apresentaram uma aparente redução, enquanto ratos com baixa ansiedade-traço apresentaram um aparente aumento da ansiedade na segunda exposição ao PEL. Esta aparente redução da ansiedade dos animais de média ansiedade-traço foi também observada no experimento I, sugerindo que talvez estes animais apresentem este comportamento por serem mais sensíveis à experiência fora da gaiola-moradia. Já o aparente aumento da ansiedade observado nos animais de baixa ansiedade-traço pode estar relacionado ao fato de que, como indivíduos com baixo traço ansioso apresentam um comportamento de alta procura pela novidade (GUNNARSDOTTIR et al., 2000), a segunda exposição ao PEL provavelmente diminui o fator novidade, o que poderia gerar uma diminuição do interesse destes animais em explorar o lado novo do aparato na segunda exposição. Assim, é altamente provável que ao invés de uma ansiedade aumentada, os animais tenham apresentado uma diminuição da curiosidade.

Embora a exposição a um ambiente enriquecido e a lesão do CPFM tenham apresentado resultados similares para o parâmetro %TLN no PEL, o mesmo não pode ser dito em relação à atividade locomotora. Enquanto a exposição ao ambiente enriquecido diminuiu a ambulação no PEL, a lesão do CPFM aumentou essa ambulação. No entanto, este achado não foi surpreendente já que estudos anteriores têm demonstrado que animais expostos a um enriquecimento ambiental apresentam menor ambulação do que aqueles mantidos em gaiolas padrão (HUGHES; COLLINS, 2010; GARRIDO et al., 2013) e que, a lesão do CPFM aumenta a atividade locomotora (JASKIW et al., 1990a; BRAUN et al., 1993; LACROIX et al., 1998). De acordo com Hughes e Collins (2010) e Garrido e colaboradores (2013), a maior estimulação motora, promovida pelo ambiente enriquecido, leva os animais a uma rápida habituação aos ambientes novos o que poderia explicar a diminuição da atividade locomotora

observada nos testes comportamentais. Ao passo que, o aumento da atividade locomotora decorrente da lesão do CPFM pode ser atribuído às alterações, induzidas por esta lesão, no sistema dopaminérgico subcortical, especialmente no estriado medial e no núcleo accumbens, levando a um aumento de dopamina nestas regiões (JASKIW et al., 1990a,b; BRAUN et al., 1993). Aqui cabe mencionar que este aumento da atividade locomotora não foi observado na PP, e isto pode ser devido ao próprio desenho do seu aparato, que por possuir diversos orifícios no chão, restringe a área livre do aparato para locomoção.

Em suma, os resultados do presente estudo mostraram que tanto o enriquecimento ambiental estabelecido na idade adulta quanto a lesão do CPFM foram capazes de diminuir os níveis de ansiedade-traço de ratos altamente ansiosos. O primeiro achado é um indicativo de que a plasticidade do cérebro adulto responde às alterações ambientais a ponto de modificar um traço de personalidade. E o segundo, fornece evidências do envolvimento do CPFM na predisposição individual a ansiedade.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo é possível concluir que o enriquecimento ambiental, estabelecido na idade adulta, foi capaz de diminuir os níveis de ansiedade-traço sem afetar os níveis de ansiedade-estado, ao passo que, a lesão do CPFM diminuiu tanto os níveis de ansiedade-traço quanto de ansiedade-estado de ratos Wistar adultos.

Além disto, estes achados fornecem novos rumos na busca por novos agentes ansiolíticos. O primeiro achado sugere que terapias ocupacionais possam ser desenvolvidas para o tratamento de transtornos ansiosos, já que a ansiedade-traço é um fator predisponente para o desenvolvimento dos mesmos (STEIMER, 2011). E o segundo, abre caminho para a exploração mais detalhada do envolvimento do CPFM nos transtornos de ansiedade, e para futuras manipulações do substrato neuroanatômico do alto traço ansioso, a fim de se desenvolver novos tratamentos para o controle da ansiedade patológica.

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 and Behavior**, v. 105, n. 3, p. 628-638, 2012.

AHMADALIPOUR, A.; SADEGHZADEH, J.; VAFAEI, A.A.; BANDEGI, A.R.; MOHAMMADKHANI, R.; RASHIDY-POUR, A. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. **Neuroscience**, v. 305, p. 372-383, 2015.

AKILLIOGLU, K.; YILMAZ, M.B.; BOGA, A.; BINOKAY, S.; KOCATURK-SEL, S. Environmental enrichment does not reverse the effects of maternal deprivation on NMDAR and Balb/c mice behaviors. **Brain Research**, v. 1624, p. 479-488, 2015.

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.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV-TR)**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 880 p.

AMIEL, J.M.; MATHEW, S.J. Glutamate and anxiety disorders. **Currente 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. Tropisetron 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.

ANDERSSON, J.D.; HALLDIN, C. PET radioligands targeting the brain GABAA/benzodiazepine receptor complex. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 56, n. 3-4, p. 196-206, 2013.

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.

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

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M.A.B.F. Modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 53-61.

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.

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.

ARIZA TRASLAVIÑA, G.A.; DE OLIVEIRA, F.L.; FRANCI, C.R. Early adolescent stress alters behavior and the HPA axis response in male and female adult rats: the relevance of the nature and duration of the stressor. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 178-189, 2014.

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.

BATISTA, P.A.; FOGAÇA, M.V.; GUIMARÃES, F.S. The endocannabinoid, endovanilloid and nitrergic systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 293, n. 182-188, 2015.

BELL, R.; DUKE, A.A.; GILMORE, P.E.; PAGE, D.; BÈGUE, L. Anxiolytic-like effects observed in rats exposed to the elevated zero-maze following treatment with 5-HT2/5-HT3/5-HT4 ligands. **Scientific Reports**, v. 4, n. 3881, p. 1-7, 2014.

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.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK ,C.G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1341-1347, 2004.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H.J.; WESTENBERG, H.G. Glutamate and anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 175-183, 2004.

BERNIK, M.A. Ansiedade normal e patológica. In: _____. **Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 59-67.

BERTOLUCCI-D'ANGIO, M.; SERRANO, A.; SCATTON, B. Mesocorticolimbic dopaminergic systems and emotional states. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 34, n. 1-3, p. 135-142, 1990.

BIAGGIO, A. M. B.; NATALÍCIO, L. **Manual para o Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE)**. Rio de Janeiro: Centro Editor de Psicologia Aplicada-CEPA, 1979. 58 p.

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.

BIELING, P.J.; ANTONY, M.M.; SWINSON, R.P. The State-Trait Anxiety Inventory, Trait version: structure and content re-examined. **Behaviour Research and Therapy**, v. 36, n. 7-8, p. 777-788, 1998.

BISHOP, S.J. Trait anxiety and impoverished prefrontal control of attention. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 92-98, 2009.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BOISSIER, J.R.; SIMON, P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. **Thérapie**, v. 17, p. 1225–1232, 1962.

BONELLI, R.M.; CUMMINGS, J.L. Frontal-subcortical circuitry and behavior. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 141-151, 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.

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, 20042008, p. 119-144.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 36-41, 2003.

BRAUN, A.A.; SKELTON, M.R.; VORHEES, C.V.; WILLIAMS, M.T. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague–Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 97, p. 406-415, 2011.

BRAUN, A.R.; JASKIW, G.E.; VLADAR, K.; SEXTON, R.H.; KOLACHANA, B.S.; WEINBERGER, D.R. Effects of ibotenic acid lesion of the medial prefrontal cortex on dopamine agonist-related behaviors in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 46, n. 1, p. 51-60, 1993.

BRENES, J.C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 89, n. 1, p. 85-93, 2008.

BRISCHOUX, F.; CHAKRABORTY, S.; BRIERLEY, D.I.; UNGLESS, M.A. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. **PNAS**, v. 106, n. 12, p. 4894-4899, 2009.

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.

CALLIER, S.; SNAPYAN, M.; CROM, S.; PROU, D.; VICENT, J.; VERNIER, P. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 7, p. 489-502, 2003.

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.

CARLSON, N.R. **Physiology of Behavior**. 11th ed. Boston: Pearson, 2013. 748 p.

CAROBREZ, A.P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 52-58, 2003.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, n. 8, p.1193-1205, 2005.

CARVALHO, M.C.; SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Dorsal periaqueductal gray post-stimulation freezing is counteracted by neurokinin-1 receptor antagonism in the central nucleus of the amygdala in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 121, p. 52-58, 2015.

CATTELL, R.B.; SCHEIER, I.H. **The Meaning and Measurement of Neuroticism and Anxiety**. New York: The Ronald Press Company, 1961. 558 p.

CATTELL, R.B.; SCHEIER, I.H. The nature of anxiety: a review of thirteen multivariate analyses comprising 814 variables. **Psychological Reports**, v. 4 (suppl: 5), p. 351-388, 1958.

CERQUEIRA, J.J.; ALMEIDA, O.F.; SOUSA, N. The stressed prefrontal 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.

CLARKE, P.J.; BROWNING, M.; HAMMOND, G.; NOTEBAERT, L.; MACLEOD, C. The causal role of the dorsolateral prefrontal cortex in the modification of attentional bias: evidence from transcranial direct current stimulation. **Biological Psychiatry**, v. 76, n. 12, p. 946-952, 2014.

CONDÉ, F.; MAIRE-LEPOIVRE, E.; AUDINAT, E.; CREPEL, F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents, **The Journal of Comparative Neurology**, v. 352, n. 4, p. 567–593, 1995.

CONNORS, E.J.; MIGLIORE, M.M.; PILLSBURY, S.L.; SHAIK, A.N.; KENTNER, A.C. Environmental enrichment models a naturalistic form of maternal separation and shapes the anxiety response patterns of offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 153-167, 2015.

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1129-1161, 2011.

DALGLEISH, T. The emotional brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 583-589, 2004.

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.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DAVIS, M. Are different parts of extended amygdala involved in fear versus anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1239-1247, 1998.

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. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 35-41, 1992.

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.

DE MELLO SCHIER, A.R.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, N.P.; COUTINHO, D.S.; MACHADO, S.; ARIAS-CARRIÓN, O.; CRIPPA, J.A.; ZUARDI, A.W.; NARDI, A.E.; SILVA, A.C. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of Cannabis sativa. **CNS and Neurological Disorders Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 953-960, 2014.

DIAMOND, M.C. Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 2, p. 211–220, 2001.

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.

DUMAN, C.H.; SCHLESINGER, L.; RUSSELL, D.S.; DUMAN, R.S. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Research**, v. 1199, p. 148-158, 2008.

DURAIRAJ, R.V.; KOILMANI, E.R. Environmental enrichment modulates glucocorticoid receptor expression and reduces anxiety in Indian field male mouse Mus booduga through up-regulation of microRNA-124a. **General and Comparative Endocrinology**, v. 199, p. 26-32, 2014.

EDELMANN, R.J. Conceptual issues. In: _____. **Anxiety: Theory, Research and Intervention in Psychology**. Chichester: Wiley, 1992, p. 1-18.

ENDLER, N.S. Stress, anxiety and coping: the multidimensional interaction model. **Canadian Psychology**, v. 38, p. 136-153, 1997.

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.

ENZ, R. $GABA_C$ receptor: a molecular view. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 8, p. 1111-1122, 2001.

EYSENCK, H.J. **The Biological Basis of Personality**. Springfield: Thomas, 1967. 390 p.

EYSENCK, M.W. Cognitive approaches to trait anxiety. In: ELIASZ, A.; HAMPSON, S.E.; DE RAAD, B. **Advances in Personality Psychology**, 2. ed. New York: Psychology Press, 2006. p. 1-16

EYSENCK, M.W. Theories of trait anxiety. In: _____. **Anxiety and Cognition: A Unified Theory**. United Kingdom: Psychology Press, 1997. p. 1-24.

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.

EYSENCK, M.W.; DERAKSHAN, N.; SANTOS, R.; CALVO, M.G. Anxiety and cognitive performance: attentional control theory. **Emotion**, v. 7, n. 2, p. 336-353, 2007.

FEATHERSTONE, D.E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n.1, p. 4-12, 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.

FLETT, G.L.; ENDLER, N.S.; FAIRLIE, P. The interaction model of anxiety and the threat of Quebec's separation from Canada. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 76, p. 143-150, 1999.

FORGAYS, D.G.; FORGAYS, J.W. The nature of the effect of free-environmental experience in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 45, n. 4, p. 322-328, 1952.

FUSS, J.; BEN ABDALLAH, N.M.; VOGT, M.A.; TOUMA, C.; PACIFICI, P.G.; PALME, R.; WITZEMANN, V.; HELLWEG, R.; GASS, P. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, v. 20, n. 3, p. 364-376, 2010.

GARCEZ, F.B.; CARVALHO, F.U.; SOARES, A.P.; GOES, T.C.; DOS SANTOS, M.R.; TEIXEIRA-SILVA, F. The influence of trait anxiety on the elevation of arterial pressure induced by L-NAME in rats. **Neuroscience Letters**, v. 583, 11-15, 2014.

GARDNER, E.L.; ASHBY Jr, C.R. Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 115-118, 2000.

GARRIDO, P.; DE BLAS, M.; RONZONI, G.; CORDERO, I.; ANTÓN, M.; GINÉ, E.; SANTOS, A.; DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G.; MORA, F. Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 5, p. 829-843, 2013.

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. Environmental enrichment for adult rats: effects on trait and state anxiety. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 93-96, 2015.

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.

GÓMEZ, F.M.; ORTEGA, J.E.; HORRILLO, I.; MEANA, J.J. Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. **Journal Oral of Rehabilitation**, v. 37, n. 11, p. 827-833, 2010.

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. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**, São Paulo: Atheneu, 2005. p. 123-160.

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.

GRATTAN, D.R. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. **The Journal of Endocrinology**, v. 226, n.2, p. 101-122, 2015.

GRAY, J.A. **The Neuropsychology of Anxiety**. Oxford: Claredon, 1982. 415 p.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. Oxford: Oxford University Press, 2a ed., 2000.

GRÉGOIRE, C.A.; BONENFANT, D.; LE NGUYEN, A.; AUMONT, A.; FERNANDES, K.J.L. Untangling the Influences of Voluntary Running, Environmental Complexity, Social Housing and Stress on Adult Hippocampal Neurogenesis. **PLoS One**, v. 9, n. 1 p. e86237, 2014.

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 potencial neophobia reducing drugs. **Behavioural Pharmacology**, v.4, n. 6, p. 637-644, 1993.

GRUNDWALD, N.J.; BRUNTON, P.J. Prenatal stress programs neuroendocrine stress responses and affective behaviors in second generation rats in a sex-dependent manner. **Psychoneuroendocrinology**, v. 62, p. 204-21, 2015.

GUNNARSDÓTTIR, E.D.; PINGITORE, R.A.; SPRING, B.J.; KONOPKA, L.M.; CRAYTON, J.W.; MILO, T.; SHIRAZI, P. Individual differences among cocaine users. **Addictive Behaviors**, v. 25, n. 5, p. 641-652, 2000.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; BHATT, S.; KURHE, Y. Role of Hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in Affective Disorders: Anti-depressant and Anxiolytic Activity of Partial 5-HT1A Agonist in Adrenalectomised Rats. **Indian Journal of Psycholological Medicine**, v. 35, n. 3, p. 290-298, 2013.

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.

HAMILTON, G.F.; JABLONSKI, S.A.; SCHIFFINO, F.L.; St CYR, S.A.; STANTON, M.E.; KLINTSOVA, A.Y. Exercise and environment as an intervention for neonatal alcohol effects on hippocampal adult neurogenesis and learning. **Neuroscience**, v. 265, p. 274-90, 2014.

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. 724-31, 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.

HANNAN, A.J. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 40, n. 1, p. 13-25, 2014.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 198-213, 2008.

HENDRIKSEN, H.; PRINS, J.; OLIVIER, B.; OOSTING, R.S. Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e11943, 2010.

HIRASE, H.; SHINOHARA, Y. Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment. **Neuroscience**, v. 280, p. 282-98, 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.

HUGHES, R.N. Food deprivation and locomotor exploration in the white rat. **Animal Behaviour**, v. 13, p. 30-32, 1965.

HUGHES, R.N.; COLLINS, M.A. Enhanced habituation and decreased anxiety by environmental enrichment and possible attenuation of these effects by chronic alpha-tocopherol (vitamin E) in aging male and female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 4, p. 534-542, 2010.

HUGHES, R.N.; OTTO, M.T. Anxiolytic effects of environmental enrichment attenuate sex-related anxiogenic effects of scopolamine in rats. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry**, v. 40, p. 252-259, 2013.

HULLINGER, R.; O'RIORDAN, K.; BURGER, C. Environmental enrichment improves learning and memory and long-term potentiation in young adult rats through a mechanism requiring mGluR5 signaling and sustained activation of p70s6k. **Neurobiology of Learning and Memory,** v. 125, p. 126-134, 2015.

HYMOVITCH, B. The effects of experimental variations on problem solving in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 45, n. 4, p. 313-321, 1952.

IBIRONKE, G.F.; UGEGE, O.G. Neurobehavioural activities of the ethanol leaf extract of calophyllum inophyllum in rodents. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 213-217, 2014.

JACOBS, B.L.; AZMITIA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p.165-229, 1992.

JASKIW, G.E.; KAROUM, F.; FREED, W.J.; PHILLIPS, I.; KLEINMAN, J.E.; WEINBERGER, D.R. Effect of ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex on amphetamine-induced locomotion and regional brain catecholamine concentrations in the rat. **Brain Research**, v. 534, n. 1-2, p. 263-272, 1990a.

JASKIW, G.E.; KAROUM, F.K.; WEINBERGER, D.R. Persistent elevations in dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens after mild subchronic stress in rats with ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex. **Brain Research**, v. 534, n. 1-2, p. 321-323, 1990b.

JONES, B.F.; GROENEWEGEN, H.J.; WITTER, M.P. Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. **Neuroscience**, v. 133, n. 1, p. 193–207, 2005.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH, A.J. **Princípios de Neurociências**, 5. ed., Porto Alegre: AMGH Editora, 2014, 1421p.

KASAHARA, K.; HASHIMOTO, S.; HATTORI, T.; KAWASAKI, K.; TSUJITA, R.; NAKAZONO, O.; TAKAO, K.; KAWAKUBO, H.; NAGATANI, T. The effects of AP521, a novel anxiolytic drug, in three anxiety models and on serotonergic neural transmission in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 109-116, 2015.

KASTENBERGER, I.; LUTSCH, C.; HERZOG, H.; SCHWARZER, C. Influence of sex and genetic background on anxiety-related and stress-induced behaviour of prodynorphin-deficient mice. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34251, 2012.

KENNEDY, B.L.; SCHWAB, J.J.; MORRIS, R.L.; BELDIA, G. Assessment of state and trait anxiety in subjects with anxiety and depressive disorders. **The Psychiatric Quarterly**, v. 72, n. 3, p. 263-276, 2001.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.

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.

KIRBY, E.D.; JENSEN, K.; GOOSENS, K.A.; KAUFER, D. Stereotaxic surgery for excitotoxic lesion of specific brain areas in the adult rat. **Journal of Visualized Experiments**, v. 65, p. e4079, 2012.

KRECH, D.; ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 53, n. 6, p. 509-519, 1960.

KURHE, Y.; MAHESH, R. Ondansetron attenuates co-morbid depression and anxiety associated with obesity by inhibiting the biochemical alterations and improving serotonergic neurotransmission. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 136, p. 107-116, 2015.

LACROIX, L.; BROERSEN, L.M.; WEINER, I.; FELDON J. The effects of excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex on latent inhibition, prepulse inhibition, food hoarding, elevated plus maze, active avoidance and locomotor activity in the rat. **Neuroscience**, v. 84, p. 431-442, 1998.

LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDER, C.A.; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behavioural Neuroscience**, v. 114, n. 6, p. 1119-1130, 2000.

LADER, M. The nature of anxiety. **British Journal of Psychiatry**, v. 121, n. 564), p. 481-91, 1972.

LEAL, P.C. **Avaliação da correlação entre ansiedade-traço e ansiedade-estado em indivíduos submetidos a situações ansiogênicas.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

LeDOUX, J. E. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biological Psychiatry**,v. 44, p. 1229-1238, 1998.

LEE, S.; KIM, D.H.; LEE, J.H.; KO, E.S.; OH, W.B.; SEO, Y.T.; JANG, Y.P.; RYU, J.H.; JUNG, J.W. Involvement of histaminergic system in the anxiolytic-like activities of Morus alba leaves in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 11, p. 1692-9, 2013.

LEGER, M.; PAIZANIS, E.; DZAHINI, K.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; CASSEL, J.C.; FRERET, T.; SCHUMANN-BARD, P.; BOULOUARD, M. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. **Cerebral Cortex**, 2014.

LIU, J.; ZHAI, W.M.; YANG, Y.X.; SHI, J.L.; LIU, Q.T.; LIU, G.L.; FANG, N.; LI, J.; GUO, J.Y. GABA and 5-HT systems are implicated in the anxiolytic-like effect of spinosin in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavio**r, v. 128, p. 41-49, 2015.

LUCAS, R.D.; NEWHOUSE J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. **A.M.A. Archives of Ophthalmology**, v.58, n. 2, p.193-201, 1957.

MAASWINKEL, H.; GISPEN, W.H.; SPRUIJT, B.M. Effects of an electrolytic lesion of the prelimbic area on anxiety-related and cognitive tasks in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 79, n. 1-2, p. 51-59, 1996.

MAINARDI, M.; LANDI, S.; GIANFRANCESCHI, L.; BALDINI, S.; DE PASQUALE, R.; BERARDI, N.; MAFFEI, L.; CALEO, M. Environmental enrichment potentiates thalamocortical transmission and plasticity in the adult rat visual cortex. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 14, p. 3048-3059, 2010.

MANZO, L.; GÓMEZ, M.J.; CALLEJAS-AGUILERA, J.E.; DONAIRE, R.; SABARIEGO, M.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; CAÑETE, A.; BLÁZQUEZ, G.; PAPINI, M.R.; TORRES, C. Relationship between ethanol preference and sensation/novelty seeking. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 53-60, 2014.

MARTIN, P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.98 (suppl: 393), p. 74-80, 1998.

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.

MCDONALD, A.J.; MASCAGNI, F.; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 55-75, 1996.

MCKINNEY, W.T. Animal models of depression: an overview. **Psychiatric Developments**, v. 2, n. 2, p.77-96, 1984.

MESA-GRESA, P.; PÉREZ-MARTINEZ, A.; REDOLAT, R. Behavioral effects of combined environmental enrichment and chronic nicotine administration in male NMRI mice. **Physiology and Behavior**, v. 114-115, p. 65-76, 2013.

MEYZA, K.Z.; BOGUSZEWSKI, P.M.; NIKOLAEV, E.; ZAGRODZKA, J. Diverse sensitivity of RHA/Verh and RLA/Verh rats to emotional and spatial aspects of a novel environment as a result of a distinct pattern of neuronal activation in the fear/anxiety circuit. **Behavior Genetics**, v. 39, n. 1, p. 48-61, 2009.

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

MISSLIN, R.; CIGRANG, M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety?. **Behavioural Processes**, v. 12, p. 45–50, 1986.

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.

MIZUKI, Y.; KAJIMURA, N.; KAI, S.; SUETSUGI, M.; USHIJIMA, I.; YAMADA, M. Differential responses to mental stress in high and low anxious normal humans assessed by frontal midline theta activity. **International Journal of Psychophysiology**, v. 12, n. 2, p. 169-178, 1992.

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.

MONTAGUD-ROMERO, S.; DAZA-LOSADA, M.; VIDAL-INFER, 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.

MORRIS, H.V.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S.; ATACK, J.R.; STEPHENS, D.N. Both alpha2 and alpha3 GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic properties of benzodiazepine site ligands in the conditioned emotional response paradigm. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 2495–2504, 2006.

MORRISON, T.R.; RICCI, L.A.; MELLONI, R.H.Jr. Anabolic/androgenic steroid administration during adolescence and adulthood differentially modulates aggression and anxiety. **Hormones and Behavior**, v. 69, p. 132-138, 2015.

MOSAFERI, B.; BABRI, S.; EBRAHIMI, H.; MOHADDES, G. Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive- and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 142, p. 131-136, 2015.

NASEHI, M.; KAFI, F.; ZARRINDAST, M.R. Differential mechanisms of opioidergic and dopaminergic systems of the ventral hippocampus (CA_3) in anxiolytic-like behaviors induced by cholestasis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1-3, p. 352-8, 2013

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697-709, 2006.

OADES, R.D.; HALLIDAY, G.M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Research**, v. 434, n. 2, p. 117-165, 1987.

ÕKVA, K.; NEVALAINEN, T.; POKK, P. The effect of cage shelf on the behaviour of male C57BL/6 and BALB/c mice in the elevated plus maze test. **Laboratory Animals**, v. 47, n. 3, p. 220-222, 2013.

OLESEN, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; WITTCHEN, H.U.; JÖNSSON, B.; CDBE2010 study group, European Brain Council. The economic cost of brain disorders in Europe. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 1, 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.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OTTERSEN, O.P.; HJELLE, O.P.; OSEN, K.K.; LAAKE, J.H. Amino Acid Transmiters. In: PAXINUS, G. **The Rat Nervous System**. 2 ed. New York: Academic Press; 1995. p. 1017-1037.

PAEZ-MARTINEZ, N.; FLORES-SERRANO, Z.; ORTIZ-LOPEZ, L.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 432-440, 2013.

PALOMERO-GALLAGHER, N.; ZILLES, K. Isocortex. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**, 3. ed. New York: Academic Press, 2004. P. 729-757.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4. ed., San Diego: Academic Press, 1998. 476 p.

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.

PESSOTTI, I. **Ansiedade**. Editora Pedagógica e Universitária, 1978.

PETROFF, O.A. GABA and glutamate in the human brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562-573, 2002.

PHILLIPS, M.L.; DREVETS, W.C.; RAUCH, S.L.; LANE, R. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 504-514, 2003.

PRATT, J.A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 55, n. 2, p. 149-181, 1992.

PRINSSEN, E.P.; NICOLAS, L.B.; KLEIN, S.; GRUNDSCHOBER, 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.

PRITCHETT, D.B.; LÜDDENS, H.; SEEBURG, P.H. Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. **Science**, v. 245, n. 4924, p.1389-1392, 1989.

RAVENELLE, R.; BYRNES, E.M.; BYRNES, J.J.; MCINNIS, C.; PARK, J.H.; DONALDSON, S.T. Environmental enrichment effects on the neurobehavioral profile of selective outbred trait anxiety rats. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 49-57, 2013.

RESSTEL, L.B.; SOUZA, R.F.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. Physiology and Behavior, v. 93, n. 1-2, p. 200-205, 2008.

REVEST, J.M.; DUPRET, D.; KOEHL, M.; FUNK-REITER, C.; GROSJEAN, N.; PIAZZA, P.V.; ABROUS, D.N. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n.10, p. 959-967, 2009.

REYNOLDS, S.; LANE, S.J.; RICHARDS, L. Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 2, n. 3, p. 120-132, 2010.

RIAD, M.; GARCIA, S.; WATKINS, K.C.; JODOIN, N.; DOUCET, E.; LANGLOIS, X.; EL MESTIKAWY, S.; HAMON, M.; DESCARRIES, L. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 417, n. 2, p. 181-194, 2000.

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.

RIBAS, G.C. As bases neuroanatômicas do comportamento: histórico e contribuições recentes. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 1, p. 63-71, 2007.

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.

ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L.; HEBERT, M.; MORIMOTO, H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research**, v. 153, p. 563-576, 1978.

ROSENZWEIG, M.R.; KRECH, D.; BENNETT, E.L.; DIAMOND, M.C. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry: a replication and extension. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 55, n. 4, p. 429-437, 1962.

RUAT, M.; TRAIFFORT, E.; LEURS, R.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; DIAZ, J.; ARRANG, J. M. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT7) activating cAMP formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 18, p. 8547-8551, 1993.

SAH, P.; FABER, E. S. L.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 803-834, 2003.

SALAM, J.N.; FOX, J.H.; DETROY, E.M.; GUIGNON, M.H.; WOHL, D.F.; FALLS, W.A. Voluntary exercise in C57 mice is anxiolytic across several measures of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 31-40, 2009.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 4, p. 233-239, 2009.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; ZANCADA-MENENDEZ, C.; BEGEGA, A.; RUBIO, S.; ARIAS, J.L. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 98, p. 1-9, 2013.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. **Molecular Neurobiology**, v. 24, n. 1-3, p. 107-29, 2001.

SCHAEFER, K.E.; ESPOSITO-SMYTHERS, C.; RISKIND, J.H.; The role of impulsivity in the relationship between anxiety and suicidal ideation. **Journal of Affective Disorders**, v. 143, n. 1-3, p. 95-101, 2012.

SCHAEFERS, A.T. Environmental enrichment and working memory tasks decrease hippocampal cell proliferation after wheel running - A role for the prefrontal cortex in hippocampal plasticity. **Brain Research**, v. 1624, p. 125-133, 2015.

SCHLOESSER, R.J.; LEHMANN, M.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H.K.; HERKENHAM, M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1152-1163, 2010.

SCHLOESSER, R.J.; MANJI, H.K.; MARTINOWICH, K. Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. **Neuroreport**, v. 20, n. 6, p. 553–557, 2009.

SCHWARCZ, R.; WHETSELL, W.O.JR.; MANGANO, R.M. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. **Science**, v. 219, n. 4582, p. 316-318, 1983.

SHAH, A.A.; TREIT, D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. **Brain Research**, v. 969, p. 183-194, 2003.

SIDDIQUI, S.V.; CHATTERJEE, U.; KUMAR, D.; SIDDIQUI, A.; GOYAL, N. Neuropsychology of prefrontal cortex. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 50, n. 3, p. 202-208, 2008.

SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 795-816, 2002.

SILVA, C.F.; DUARTE, F.S.; LIMA, T.C.; DE OLIVEIRA, C.L. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 85-90, 2011.

SIMON, P.; PANISSAUD, C.; COSTENTIN, J. Anxiogenic-like effects induced by stimulation of dopamine receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 3, p. 685-690, 1993.

SIMPSON, J.; KELLY, J.P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats – Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 246-64, 2011.

SKÓRZEWSKA, A.; LEHNER, M.; WISŁOWSKA-STANEK, A.; TURZYŃSKA, D.; SOBOLEWSKA, A.; KRZĄŚCIK, P.; PŁAŹNIK, A. GABAergic control of the activity of the central nucleus of the amygdala in low- and high-anxiety rats. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 566-576, 2015.

ŠLAMBEROVÁ, R.; POMETLOVÁ, M.; MACÚCHOVÁ, E.; NOHEJLOVÁ, K.; STUCHLÍK, A.; VALEŠ, K. Do the effects of prenatal exposure and acute treatment of methamphetamine on anxiety vary depending on the animal model used? **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 361-369, 2015.

SMAERS, J.B.; STEELE, J.; CASE, C.R.; COWPER, A.; AMUNTS, K.; ZILLES, K. Primate prefrontal cortex evolution: human brains are the extreme of a lateralized ape trend. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 77, n. 2, p. 67-78, 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. 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.

STAHL, S.M. Anxiolytics and sedative-hypnotics. In: _____. **Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 388-419.

STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, p. 495-506, 2011.

STERN, C.A.J.; DO MONTE, F.H.M.; GAZARINI, L.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L.J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 214-222, 2010.

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, n. 162, p. 1-17, 2015.

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.

SZTAINBERG, Y.; KUPERMAN, Y.; TSOORY, M.; LEBOW, M.; CHEN, A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 9, p. 905-917, 2010.

TAKAHASHI, T.; SHIMIZU, K.; SHIMAZAKI, K.; TODA, H.; NIBUYA, M. Environmental enrichment enhances autophagy signaling in the rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1592, p. 113-23, 2014.

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.

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.

TRAINOR, B.C. Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences. **Hormone and Behavior**, v. 60, n. 5, p. 457-469, 2011.

UNGLESS, M.A. Dopamine: the salient issue. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 12, p. 702-706, 2004.

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 DER STAAY, F.J. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 1, p. 131-159, 2006.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 266-270, 1999.

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.

VEY, L.T.; ROSA, H.Z.; BARCELOS, R.C.; SEGAT, H.J.; METZ, V.G.; DIAS, V.T.; DUARTE, T.; DUARTE, M.M.; BURGER, M.E. Stress during the gestational period modifies pups' emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 15, p. 30145-5, 2015.

VIANA, M.C.; ANDRADE, L.H. Lifetime Prevalence, Age and Gender Distribution and Age-ofOnset of Psychiatric Disorders in the São Paulo Metropolitan Area, Brazil: Results from the São Paulo Megacity Mental Health Survey. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 3, p. 249-260, 2012.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WALKER, D.L.; TOUFEXIS, D.J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 199-216, 2003.

WANG, X.; ZHONG, P.; YAN, Z. Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 9185–9193, 2002.

WANG, Y.; QIN, Z. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, n. 11, p. 1382-1402, 2010.

WIERONŃSKA, 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

WILL, B.; GALANI, R.; KELCHE, C.; ROSENZWEIG, M.R. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). **Progress in Neurobiology**, v. 72, n. 3, p. 167-182, 2004.

WISŁOWSKA-STANEK, A.; LEHNER, M.; SKÓRZEWSKA, A.; KRZĄŚCIK, P.; MACIEJAK, P.; SZYNDLER, J.; ZIEMBA, A.; PŁAŹNIK, A. Changes in the brain expression of alpha-2 subunits of the GABA-A receptor after chronic restraint stress in low- and high-anxiety rats. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 337-345, 2013.

WOO, C.C.; DONNELLY, J.H.; STEINBERG-EPSTEIN, R.; LEON, M. Environmental enrichment as a therapy for autism: A clinical trial replication and extension. **Behavioral Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 412-422, 2015.

YEUNG, M.; TREIT, D.; DICKSON, C.T. Ventral hippocampal histamine increases the frequency of evoked theta rhythm but produces anxiolytic-like effects in the elevated plus maze. **Neuropharmacology**, v. 15, p. 30116-7, 2015.

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.; KHAKPAI, F. The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 9, p. 591-603, 2015.

ZHU, S.W.; YEE, B.K.; NYFFELER, M.; WINBLAD, B.; FELDON, J.; MOHAMMED, A.H. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 169, n. 1, p. 10-20, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO (ARTIGO I)

Neuroscience Letters 584 (2015) 93–96

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Environmental enrichment for adult rats: Effects on trait and state anxiety

Tiago Costa Goes, Fabrício Dias Antunes, Flavia Teixeira-Silva*

Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária "Prof. José Aloísio de Campos", 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil

HIGHLIGHTS

- The effects on anxiety of late-life environmental enrichment were investigated in adult rats.
- Both trait (free-exploratory paradigm) and state (elevated plus-maze test) anxiety were tested.
- Environmental enrichment decreased trait anxiety of highly anxious rats.
- Environmental enrichment did not affect state anxiety.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 August 2014
Received in revised form 2 October 2014
Accepted 3 October 2014
Available online 12 October 2014

Keywords:
Enriched environment
Anxiety
Free-exploratory paradigm
Elevated plus-maze

ABSTRACT

Experimental evidence indicates that enriched environment (EE) induces neurobiological and behavioural alterations. EE in early life improves learning and memory and reduces trait and state anxiety. However, the effect of EE established in adulthood has rarely been investigated. Thus, the aim of this study was to evaluate the possibility of modifying the levels of trait and/or state anxiety of adult rats exposed to EE. Seventy adult Wistar male rats were first tested in the free-exploratory paradigm (FEP) and were categorized according to their levels of trait anxiety (high, medium and low). Subsequently, half of the animals from each category returned to their home cages (standard condition: SC) and the other half was transferred to an enriched environment (enriched condition: EC). After three weeks, all animals were again tested in FEP. Seven to 10 days later, fifty of the seventy animals were tested on the elevated plus-maze test (EPM). In FEP, EE reduced locomotor activity in the second exposition independently of the anxiety category and, it decreased the levels of trait anxiety of highly anxious rats. No effect of EE was observed on EPM. In conclusion, EE established in adulthood was able to reduce high trait anxiety, a major risk factor for anxiety disorders.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO (ARTIGO II)

ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO E INDIRETAMENTE RELACIONADOS À TESE

SCIENTIA PLENA VOL. 9, NUM. 12 2013
www.scientiaplena.org.br

Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre

T. C. Goes, F. D. Antunes, T. H. Almeida-Souza, F. R. C. Ursulino, F. B. Garcez, A. L. L. Melo, F. Teixeira-Silva

Departamento de Fisiologia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão – SE, Brasil.

tiagofarmaufs@yahoo.com.br

(Recebido em 12 de junho de 2013; aceito em 20 de dezembro de 2013)

O Paradigma da Exploração Livre (PEL) tem sido proposto como um modelo animal de ansiedade-traço e, portanto, um modelo de escolha para categorizar os roedores de linhagens heterogênicas de acordo com o seu perfil ansioso. Para tanto se faz necessário conhecer o comportamento destes roedores no referido modelo. Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever os parâmetros comportamentais de ratos Wistar, machos, no PEL. Trezentos e sessenta ratos Wistar, machos, foram submetidos ao PEL. Os seguintes parâmetros foram avaliados: porcentagem de tempo no ambiente novo (%TAN), porcentagem de "rearing" no ambiente novo (%RAN), porcentagem da distância no ambiente novo (%DAN), número de tentativas de aproximação do ambiente novo e distância total percorrida. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil e, média ± desvio padrão. A preferência pela novidade foi avaliada por teste t para uma amostra, em que se comparou a média da %TAN, da %RAN e da %DAN a 50%. Os resultados mostraram que os parâmetros %TAN, %RAN e %DAN apresentaram uma média significativamente maior que 50%, demonstrando uma preferência dos animais pelo ambiente novo, conforme descrito na literatura referente a este modelo. Além disso, os valores aqui obtidos do parâmetro %TAN serão muito úteis para futuros estudos que necessitem categorizar os animais de acordo com seu perfil ansioso.

Palavras-chave: ansiedade-traço, paradigma da exploração livre, ratos Wistar.

Behavior of Wistar rats in the free-exploratory paradigm

The free-exploratory paradigm (FEP) has been proposed as an animal model of trait anxiety and thus a model of choice to categorize heterogeneous strains of rodents, according to their anxious profile. In this context, it is important to identify and measure the behavior of these rodents on the FEP. Therefore, the aim of this study was to describe the behavioral parameters of male Wistar rats exposed to FEP. Three hundred and sixty drug-naive, adult, male Wistar rats were tested on FEP and the following parameters were evaluated: percentage of time in the novel side (%TNS), percentage of time rearing in the novel side (%RNS), percentage of distance travelled in the novel side (%DNS), attempts to enter the novel side and total distance travelled. The data obtained were expressed as median and interquartile range and as mean ± standard deviation. The preference of novelty was assessed by one sample t test. The analysis revealed that %TNS, %RNS and %DNS were significantly higher than 50%, showing a preference for novelty, as described in the literature. Furthermore, the values of the behavioral parameters %TNS obtained here will be very useful for future studies requiring to categorize animals according to their anxious trait.

Keywords: free-exploratory paradigm, trait anxiety , Wistar rats.

Neuroscience Letters 580 (2014) 137–141

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in female rats: Test–retest reliability

Débora Ramiro de Oliveira, Tiago Costa Goes, Flavia Teixeira-Silva*

Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária "Prof. José Aloísio de Campos", 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil

HIGHLIGHTS

- The free-exploratory paradigm (FEP) has been proposed as a model of trait anxiety.
- FEP has been proven stable over time, but only for male rats.
- There are sex influences at all levels of the nervous system.
- This study assessed the stability over time of FEP for female rats.
- Stability over time was found for three of the four evaluated parameters.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 March 2014
Received in revised form 6 July 2014
Accepted 4 August 2014
Available online 12 August 2014

Keywords:
Free-exploratory paradigm
Trait anxiety
Animal models
Test–retest
Female rats

ABSTRACT

The free-exploratory paradigm has been proposed as a model of trait anxiety and as such has been proven stable over time, which is a *sine qua non* condition for any model proposing to evaluate a personality trait. However this stability has only been shown for male rats. Considering that anxiety disorders are most prevalent in women, it's crucial that females are tested in animal models. With this in mind, the stability over time of female rats in the free-exploratory paradigm was evaluated using a test-retest procedure. The behaviour of drug-naive, adult, female, Wistar rats was measured in the free-exploratory apparatus on two occasions two months apart. The following parameters were evaluated: percentage of distance travelled in the novel compartment; number of attempts to enter the novel compartment; percentage of time spent in the novel compartment; and percentage of time rearing in the novel compartment. Subsequently, the intraclass correlation coefficient (ICC) and the kappa index (κ) were calculated for each of these parameters. The "percentage of time spent in the novel compartment" (ICC = 0.727; κ = 0.457), the "percentage of distance travelled in the novel compartment" (ICC = 0.680; κ = 0.370), and the "percentage of time rearing in the novel compartment" (ICC = 0.648; κ = 0.309) were found to be stable over time. Analysis of these parameters indicated fair to substantial reliability over time in two-month inter-trial interval. Therefore, our results support the idea of the free-exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety for female rats.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Neuroscience Letters 583 (2014) 11–15

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

The influence of trait anxiety on the elevation of arterial pressure induced by L-NAME in rats

Flávia Barreto Garcez, Fábio Ursulino Reis Carvalho, Ana Paula dos Santos Soares, Tiago Costa Goes, Márcio Roberto Viana dos Santos, Flavia Teixeira-Silva*

Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil

HIGHLIGHTS

- The relationship between anxiety and elevated blood pressure was investigated in rats.
- L-NAME (20 mg/kg/day – 7 days) increases blood pressure only in high trait anxiety rats.
- Blood pressure elevation (short term) does not affect trait anxiety.
- The higher the trait anxiety, the higher the blood pressure peak in response to L-NAME.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 April 2014
Received in revised form 5 August 2014
Accepted 2 September 2014
Available online 16 September 2014

Keywords:
Trait anxiety
Hypertension
L-NAME
Rats
Free-exploratory paradigm
Blood pressure

ABSTRACT

Due to the high prevalence of anxiety disorders and hypertension comorbidity in the general population, the establishment of anxiety as a risk factor for elevated blood pressure, or the reverse, is of great relevance. In this context, animal models can be of great scientific value, as they permit the control of several variables. Bearing this in mind, the influence of anxiety, not as a state, but as a personality trait (trait anxiety), on blood pressure elevation and vice versa were investigated for the first time in rats, using the free-exploratory paradigm (FEP). Sixty adult male Wistar rats were evaluated on FEP and categorized according to their levels of anxiety. From this sample, 24 animals with high ($n = 12$) and low ($n = 12$) trait anxiety were allocated to two treatment groups: (1) L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester, 20 mg/kg, p.o., for 7 days to increase blood pressure; $n = 6$/anxiety category); (2) CTRL (tap water, p.o., for 7 days; $n = 6$/anxiety category). During treatment, measurements of systolic blood pressure (SBP) were taken daily. After treatment, the animals were again tested on FEP. SBP and trait anxiety levels were compared pre- and post-treatment. Additionally, correlations between trait anxiety levels and SBP increases (L-NAME group) were analyzed. The results showed that L-NAME was able to induce significant SBP elevation, but only for the high-anxious animals, while SBP elevation did not significantly interfere with anxiety levels. A significant correlation between anxiety levels and SBP peaks in response to L-NAME was also shown. No differences were observed between the levels of anxiety before and after treatment. These findings suggest that individuals with high trait anxiety are more susceptible to increases in blood pressure, but that high blood pressure does not affect the levels of trait anxiety.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 135 (2015) 114–120

Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Pharmacological validation of the free-exploratory paradigm in male Wistar rats: A proposed test of trait anxiety

Thiago Henrique Almeida-Souza [1], Tiago Costa Goes [1], Flavia Teixeira-Silva *

Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão, SE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 December 2014
Received in revised form 18 March 2015
Accepted 27 March 2015
Available online 28 May 2015

Keywords:
Diazepam
Fluoxetine
Pentylenetetrazole
Animal model
Trait anxiety

ABSTRACT

The free-exploratory paradigm (FEP) has been proposed as a model of trait anxiety for both mice and rats. However, its pharmacological validation has only been carried out for the mice. Thus, the aim of the present study was to pharmacologically validate FEP for Wistar rats, by testing the effects of clinically established anxiolytic and anxiogenic drugs, in four different experiments. In all experiments, male Wistar rats were first tested in FEP to be categorized according to their levels of trait anxiety (high, medium and low). Then, only medium trait anxiety rats were selected to be tested again in FEP, two weeks later, after being pharmacologically treated, according to each experiment as follows: Experiment I: 0.5 mg/kg of diazepam (DZP) or vehicle; Experiment II: 20 mg/kg of pentylenetetrazole (PTZ) or vehicle; Experiment III: 5 mg/kg of fluoxetine (FLX5) or vehicle: and Experiment IV: 0.5 mg/kg of fluoxetine (FLX0.5) or vehicle. As a group, the results showed that PTZ and FLX5 increased levels of trait anxiety and reduced locomotor activity, whereas DZP and FLX0.5 decreased levels of trait anxiety, without impairing locomotor activity. These results demonstrate that FEP for rats is able to predict clinical anxiolytic and anxiogenic activities of different drugs, including fluoxetine, which is believed to present a dual effect on anxiety. Therefore, this paradigm can be proposed as an effective method for testing potential trait anxiety-reducing drugs, in rats.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.