

Carlos Alberto da Silva Ribeiro

**BATERIA SEQUENCIAL DE PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA EM
CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Farmacologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirtes Costa

Botucatu

2010

Carlos Alberto da Silva Ribeiro

**BATERIA SEQUENCIAL DE PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA EM
CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Farmacologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirtes Costa

Botucatu

2010

AGRADECIMENTO

Muitas pessoas contribuíram para que esse trabalho fosse concluído. Porém, algumas em especial foram indispensáveis. E não posso deixar de as mencionar neste breve agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todos os momentos de desabafo e súplicas de ajuda e direcionamento, que, sempre com boa vontade, Ele me deu.

Em segundo, aos meus pais por todo o apoio que só bons pais poderiam dar: amor, carinho, motivação *et coetera*.

À minha orientadora, pelas orientações científicas e didáticas. Sem contar da enorme paciência, que sei que teve que buscar de longe pra confrontar com minhas indagações.

Aos meus irmãos, pelas discussões árduas sobre todos os tipos de assunto.

À minha namorada Raquel, pela ação ansiolítica e antidepressiva, por todos os momentos científicos e construtivos que tivemos... Pela paciência que teve em todos eles.

Aos meus colegas de laboratório, pela contribuição, em todos os aspectos, para a execução desta pesquisa.

Por último e não menos importante, aos meus amigos novos e antigos que sempre cumpriram com seus papéis de amigos: afeto, compreensão, descontração e, obviamente, muita paciência comigo (preciso repensar essa história de ‘paciência’...).

... Novamente, dou mais um passo em minha vida rumo ao imenso mundo de procuras e descobertas sobre o infindável mistério que perturba as maiores mentes, e a toda humanidade: a própria vida.

Novas informações são adicionadas a cada momento, como se fosse uma máquina de armazenamento. Informações vindas de toda parte... Diferentes partes, de todo tipo de conhecimento, e, algumas poucas vezes, processadas pelo meu cérebro com intento de entender que todas essas informações são partes meras de uma coisa só.

Porém, ainda me intriga quando o passo é dado em direção ao imenso mundo nanômico das células neuronais e suas intervenções no comportamento humano. É sabido que o comportamento animal é um conjunto de atitudes e reações do indivíduo frente a um estímulo qualquer. Sinais físico-químicos, e posteriormente elétricos, são transmitidos a outros neurônios, os quais respondem de maneira apropriada (ou não), desencadeando manifestações fisiológicas ou psíquicas (Se essas últimas não forem partes das primeiras). Mas, o que faz uma pessoa assumir uma postura diante de um estímulo? Se, é puramente instintivo, ou “robótico”, por que é possível decidir? Onde ocorre essa decisão? Em qual neurônio e em que parte dele? Será que são vários? O que acontece dentro de cada neurônio que motiva uma pessoa a decidir qual atitude tomar diante de um acontecimento? Esses neurônios motivam ou determinam as ações? O comportamento é definido pelos neurônios, ou pela pessoa? Ou tudo é uma coisa só? Por que outras células não fazem isso? Os neurônios são células que pertencem aos animais, ou são os próprios animais?

Toda essa angústia de querer essas respostas deve fazer parte do repertório de questionamento de muita gente... A angústia, restrinjo-a apenas a mim, mas, com certeza, alguém a deve compartilhar comigo. Respostas que talvez nunca tenhamos, pois talvez, buscamos em lugar errado. De repente, não é baixando a cabeça diante de um microscópio que vamos encontrar essas respostas... E sim, erguendo-a.

RESUMO

As desordens ansiosas e a depressão estão entre as doenças mais frequentes e que acometem o sistema nervoso central no mundo, e aparecem juntas em grande parte dos casos, o que pode ser ainda mais prejudicial ao paciente. Por isso, a pesquisa clínica e pré-clínica nessa área são a chave para a descoberta de um tratamento adequado. Na pesquisa pré-clínica, são utilizados protocolos que reúnem vários modelos comportamentais para refinar o estudo do comportamento animal, porém, há dúvidas de que possa existir interferência nos dados de um procedimento quando é utilizado o mesmo animal. Assim, o objetivo maior deste estudo é conhecer a possível interferência de procedimentos sucessivos no mesmo animal, de modo a se estabelecer uma bateria sequencial de procedimentos para a avaliação de atividade ansiolítica e antidepressiva. Foram utilizados camundongos suíços, os quais foram submetidos a exposições consecutivas a dois diferentes procedimentos experimentais, com intervalo de 30 minutos entre cada uma. Foram detectadas interferências decorrentes da pré-exposição a determinados procedimentos, das quais algumas foram solucionadas apenas com a inversão na ordem de exposição. Após a identificação dos procedimentos que não promoviam interferência sobre os parâmetros avaliados no procedimento posterior, foi estabelecida uma bateria sequencial, que possibilita a reutilização dos animais, otimizando o uso de substâncias e dos próprios animais.

Palavras-chave: Bateria sequencial. Ansiedade. Depressão. Teste do campo aberto. Teste da caixa claro-escuro. Teste da suspensão pela cauda.

ABSTRACT

Anxiety disorders and depression, both ranked among the most frequent diseases, afflict the central nervous system. They are comorbid in most cases, which can thus be even more prejudicial to the patient. For this reason, pre-clinical and clinical research in this area constitutes the key to discovering an adequate treatment. Pre-clinical research utilizes protocols that combine several behavioral models to refine the study of animal behavior. However, doubts arise from possible interference in data from a procedure that utilizes the same animal. Thus, the primary objective of the present study is to ascertain the potential interference of successive procedures on the same animal, so as to establish a sequential battery of procedures to evaluate antidepressive and anxiolytic activity. Swiss mice were utilized and submitted to consecutive exposures to two different experimental procedures, separated from each other by a 30-minute interval. Interferences resulting from pre-exposure to determinate procedures were detected, some of which were resolved only by inverting the order of exposure. After the identification of procedures that did not interfere with parameters evaluated in a subsequent procedure, a sequential battery was established to enable the reutilization of animals, thus optimizing the use of substances and of the animals themselves.

Keywords: Sequential battery. Anxiety. Depression. Open-field test. Light-dark box test. Tail suspension test.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

- REPRESENTANTE DISCENTE JUNTO AO PROGRAMA DE FARMACOLOGIA (2009 E 2010)

- DISCIPLINAS CURSADAS

Disciplina	N. de Semestre créditos Conceito		
Classificação de Receptores Farmacológicos	1º	4	A
Farmacocinética	1º	3	A
Parâmetros de Sensibilidade a Drogas: Modelos Experimentais	1º	4	A
Tópicos de Atualização em Ciências	1º	1	A
Metodologia e Redação Científica	1º	4	A
Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático	2º	3	A
Testes Estatísticos Aplicados à Farmacologia	2º	2	B
Tópicos de Atualização em Ciências	2º	1	A
Comportamento Animal	2º	4	A
Neurofarmacologia e Comportamento	3º	2	A
Plantas Medicinais: Abordagens de Estudo Interdisciplinar	3º	6	B
Tópicos de Atualização em Ciências	3º	1	A

- PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS
 - IX WORKSHOP DA PÓS-GRADUAÇÃO & X WORKSHOP DA GENÉTICA. UNESP – BOTUCATU, 2010.
 - Organização do evento
 - VIII WORKSHOP DA PÓS-GRADUAÇÃO. INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU – UNESP, 2009.
 - Organização do evento
 - Minicurso ministrado: RIBEIRO, C.A.S.; FERREIRA, F.G. & SANTOS, R.C. Potencial Farmacológico de Plantas - Sistema Nervoso Central e Trato Gastrintestinal.
 - Avaliação de resumos e painéis.
 - Organização de Livro: LEMKE, N.; RIBEIRO, C.A.S.; SANTOS, R.C.; FERREIRA, F.G.; FONSECA FILHO, P.R. *Ensaio em Biociências*. Botucatu – Unesp, 109 p.
 - Capítulo de livro: RIBEIRO, C.A.S.; Ferreira, F.G.; SANTOS, R.C. *Potencial Farmacológico de Plantas - Sistema Nervoso Central, Trato Gastrintestinal, Analgesia e Inflamação*. In: Lemke, N.; RIBEIRO, C.A.S.; SANTOS, R.C.; Ferreira, F.G.; Fonseca Filho, P.R. *Ensaio em Biociências*. Botucatu – Unesp, p. 98 – 109.

- 2º CONGRESSO IBEROAMERICANO DE FITOTERAPIA. LISBOA, PORTUGAL, 2009.

- Apresentação de painéis: SANTOS, R.C.; RIBEIRO, C.A.S.; FERREIRA, F.G.; COSTA, M.; HURUMA-LIMA, C.A. Efeito Antinociceptivo do Eucaliptol, Composto Majoritário de *Eucalyptus* sp. em Camundongos;

SANTOS, R.C.; FERREIRA, F.G.; RIBEIRO, C.A.S.; COSTA, M.; HURUMA-LIMA, C.A. Efeito Antinociceptivo do Óleo Essencial de *Caryophyllus aromaticus* L. e seu Composto Majoritário (Eugenol) em Camundongos.

- XXIV REUNIÃO ANUAL DA FESBE. ÁGUAS DE LINDOIA, 2009.

- MINI-CURSO: Cognição: Uma Perspectiva Interdisciplinar

- Apresentação de painéis: RIBEIRO, C.A.S.; FERREIRA, F.G. & COSTA, M. Comportamento de Camundongos no Labirinto em Cruz Elevado, Caixa Claro-escuro e Campo Aberto: Análise da Interferência de Exposições Sucessivas;

FERREIRA, F.G.; RIBEIRO, C.A.S. & COSTA, M. Exposição ao Aparato Utilizado para Administração de Drogas por Via Inalatória em Camundongos: Interferência Diferencial em Comportamentos para Avaliar Ansiedade.

- I CONGRESSO IBRO/LARC DE NEUROCIÊNCIAS DA AMÉRICA LATINA, CARIBE E PENÍNSULA IBÉRICA. ARMAÇÃO DOS BÚZIOS, 2008.
 - Mini-curso: Modelos Animais em Neurociências
 - Apresentação de painéis: RIBEIRO, C.A.S.; FERREIRA, F.G. & COSTA, M. Interferência de Exposições Múltiplas sobre os Parâmetros Comportamentais Avaliados em Modelos Experimentais de Ansiedade em Camundongos;

KÖHN, D.O.; RIBEIRO, C.A.S.; COSTA, C.A.R.A.; COSTA, M. Avaliação da Interferência do Ciclo Circadiano sobre os Comportamentos de Camundongos Avaliados no Labirinto em Cruz Elevado.

- XX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (CIC). SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 2008.
 - AVALIAÇÃO DE PAINÉIS E TRABALHOS COMPLETOS.

- XX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL E X INTERNACIONAL CONGRESS OF ETHNOPHARMACOLOGY. SÃO PAULO, 2008.
 - MINI-CURSO: Modelos Animais de Desordem Psiquiátrica e Neurodegenerativa.

- VII WORKSHOP DA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU – UNESP, 2008.

- Mini-curso: Biologia Molecular Aplicada à Fisiologia do Exercício

- VIII WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU 2008.
 - Mini-curso: Fitoquímica, Farmacologia e Fitoterapia

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BA	Braço aberto
BF	Braço fechado
CPA	Campo aberto
CCE	Caixa claro-escuro
CTL	Controle
DZP	Diazepam
fig.	Figura
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IMI	Imipramina
LCE	Labirinto em cruz elevado
P-E	Pré-exposição
SAL	Salina
SPC	Suspensão pela cauda
tab.	Tabela
TWN	Tween

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
1.1 RELAÇÃO ENTRE TRANSTORNO DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO.....	13
1.1.1 DEPRESSÃO.....	14
1.1.2 TRANSTORNO DE ANSIEDADE.....	15
1.1.3 COMORBIDADE.....	17
1.2 MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA.....	17
1.3 MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA..	20
1.4 EXPERIÊNCIA PRÉVIA E BATERIA SEQUENCIAL.....	22
1.5 ÉTICA EXPERIMENTAL E RENDIMENTO DE PRODUTOS NATURAIS	23
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 SUJEITOS DA PESQUISA.....	26
3.2 ESCOLHA DOS MODELOS COMPORTAMENTAIS.....	26
3.3 MODELOS PARA ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	27
3.4 GRUPOS DE COMPARAÇÃO.....	30
3.4.1 EXPERIMENTO 1.....	30
3.4.2 EXPERIMENTO 2.....	32
3.4.4.1 Drogas e Tratamentos.....	33
3.5 REGISTRO E ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	34
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 EXPERIMENTO 1.....	35
4.2 EXPERIMENTO 2.....	42
5 CONCLUSÃO.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 RELAÇÃO ENTRE DEPRESSÃO E TRANSTORNO DE ANSIEDADE

A depressão e os transtornos de ansiedade estão entre as de ocorrência mais frequente dentre as que acometem o sistema nervoso central (SNC) na população mundial. Em um estudo feito em dois países da Europa, estimou-se que a depressão maior ocupava 6,3%, e os transtornos de ansiedade generalizada, 8,3% dos casos nos pacientes estudados, e que 4,2% apresentam as duas doenças ao mesmo tempo (ANSSEAU *et al.*, 2005). Esses valores são preocupantes quando se tratam de estados clínicos de difícil diagnóstico e que comprometem seriamente a vida social dessas pessoas.

Tanto os transtornos de ansiedade quanto a depressão são desordens cujo tratamento disponível não atende a uma grande parcela dos acometidos. Além disso, são clássicos os efeitos adversos destes medicamentos, que incluem sonolência, ataxia e perda de memória para os ansiolíticos, e boca seca, taquicardia, aumento de peso e disfunção sexual para os antidepressivos (GOODMAN & GILMAN, 2007). Essa gama de efeitos adversos provocada pelos medicamentos mais utilizados, comumente, dificulta a adesão do paciente ao tratamento, aumentando o risco de um novo episódio.

1.1.1 DEPRESSÃO

A depressão, também chamada de psicose de depressão mental, ou depressão unilateral, é uma doença do SNC caracterizada por causar sintomas de pesar, infelicidade, desespero e miséria, com elevado risco de suicídio nos pacientes, o qual pode variar com o gênero, idade ou etnia (SHARMA *et al.*, 2007; SHER, OQUENDO & MANN, 2001). A principal causa da depressão está associada, de maneira geral, a uma baixa disponibilidade de serotonina ou noradrenalina, ou ambas, no cérebro. Acredita-se que, além da serotonina, uma disfunção em seus precursores também esteja envolvida, e que o eixo adrenal-pituitário-hipotalâmico desempenhe uma função importante nessa doença (LOPEZ-DURAN, KOVACS & GEORGE, 2009; MAES *et al.*, 1995).

A atividade noradrenérgica dos neurônios localizados no *locus coeruleus*, no tronco cerebral (ZHU *et al.*, 1999), assim como a de neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe (MICHELSEN, PRICKAERTS & STEINBUSCH, 2008; MICHELSEN, SCHMITZ & STEINBUSCH, 2007), está envolvida com essa doença. Ambos os tipos de neurônios enviam muitas projeções para o sistema límbico, conjunto de estruturas que está relacionado com processos neurais responsáveis por modular o comportamento emocional dos animais, inclusive em humanos (GRAY, 1985; KIRKPATRICK, KIM, & INSEL, 1994). Com isso, nota-se que uma falha estrutural ou fisiológica nesse sistema de comunicação, na qual a neurotransmissão de serotonina e

noradrenalina é prejudicada, poderia desencadear a manifestação dos sintomas da depressão. Tais sintomas são tratados, na clínica, com medicamentos que têm como principal característica aumentar a disponibilidade desses neurotransmissores.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência da depressão na população mundial era de 151,2 milhões de pessoas em 2004, sendo duas vezes mais frequente nas mulheres que nos homens. Além disso, numa escala de incapacidade causada por doenças que varia de 1 a 7, é dada a pontuação máxima (incapacidade severa) à depressão, juntamente com outras doenças graves como psicose ativa e câncer em estado terminal. Em uma graduação de doenças ou situações que mais acometeram a população mundial em anos de vida perdidos por incapacidade, essa desordem ocupava, em 2004, a terceira colocação – atrás apenas de infecções respiratórias e diarreia; e a estimativa para 2030, é que a depressão ocupará o topo dessa lista. Em países de baixa e média renda, esta incapacidade atinge uma média de 10,4% do total de anos perdidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

1.1.2 TRANSTORNO DE ANSIEDADE

A ansiedade é o nome dado ao comportamento normal dos animais diante de situações que possam representar um possível dano, perigo ou malogro, e cujo resultado, oriundo de processos neurais complexos, culmina em

manifestações fisiológicas autônomas como sudorese, taquicardia e tremores entre outras. Em contra partida, o transtorno de ansiedade é caracterizado por um desarranjo na manutenção desse processo sem causa aparente, que prejudica a vida sócio-profissional das pessoas que sofrem desse mal. Esse transtorno pode também ser denominado como desordem ou, de maneira inadequada, apenas ansiedade.

Em estudos realizados no Brasil, os dados mostram que entre 10% e 18% da população apresenta algum transtorno de ansiedade, dos quais 6% a 12% são casos que potencialmente necessitam de assistência (ALMEIDA FILHO *et al.*, 1992; 1997). Apesar dos avanços observados no tratamento dos transtornos de ansiedade nos últimos anos, estima-se que menos de 50% dos pacientes portadores de transtorno de ansiedade generalizada apresentem alívio total dos sintomas, indicando a necessidade de continuidade da pesquisa pré-clínica e clínica nesse campo (ANDREATINI *et al.*, 2001). Bem como a depressão, existe um alto risco de tentativas de suicídio em pacientes com transtornos de ansiedade (LEE *et al.*, 2007), mostrando que é um transtorno que merece uma maior vigilância e prevenção dos pesquisadores e profissionais de saúde.

1.1.3 COMORBIDADE

Os transtornos de ansiedade e a depressão sempre foram tratados como doenças distintas, porém, em uma revisão (WETZLER & KATZ, 1989) onde estavam incluídos 17 estudos entre pacientes com ansiedade e depressão, foi estimado que em cerca de 50% dos casos essas desordens aparecem juntas. Outros estudos também corroboram com a idéia de comorbidade entre essas doenças, além de apontarem que tratamentos contra os transtornos de ansiedade diminuem o risco de depressão maior nos pacientes (GOODWIN & GORMAN, 2002; GORMAN, 1997). Além disso, algumas condições de dor, como enxaqueca, artrite e dores nas costas, aparecem sempre em maior intensidade em pacientes com depressão e desordens de ansiedade (McWILLIAMS, GOODWIN & COX, 2004), levando-nos a crer que são comorbidades que merecem uma importante atenção dos pesquisadores das desordens do sistema nervoso central.

1.2 MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

De um modo geral, os modelos comportamentais para o estudo da atividade ansiolítica avaliam a resposta dos animais de experimentação frente ao conflito natural quando expostos a um ambiente desconhecido. Nessa situação, a atividade exploratória do animal reflete o resultado do conflito entre a tendência

de explorar a nova área e a neofobia, ou seja, medo de um ambiente novo. Embora o paradigma básico seja o mesmo, os estímulos oferecidos em cada modelo experimental são diferentes, e cada procedimento avalia um determinado componente do processo ansioso.

Os modelos comportamentais comumente utilizados na busca de drogas ansiolíticas são o labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987), no qual o conflito comportamental é a necessidade do animal em explorar o ambiente e o potencial perigo que ela oferece, ou seja, uma maior exposição do animal quando está nos braços abertos do labirinto; a caixa claro-escuro (CRAWLEY, 1981), que também oferece ao animal um conflito entre explorar o ambiente novo e evitar o compartimento claro, aversivo aos animais de hábitos noturnos; e a placa perfurada (BOISSIER & SIMON, 1962), onde a atividade ansiolítica é medida pelo número de mergulhos com a cabeça (*head-dipping*) que o animal realiza nas perfurações, os quais o deixam vulnerável ao ataque de um possível predador.

O teste do campo aberto (WALSH & CUMMINS, 1976) e da barra giratória (DUHAM & MIYA, 1957) são comumente utilizados para detecção de alterações na atividade locomotora, como auxílio na complementação dos dados obtidos nos modelos de atividade ansiolítica. Essas alterações podem ser geradas pela ação ansiolítica dos próprios modelos ou podem ser atribuídas a outras alterações menos específicas sobre o sistema motor (RODGERS *et al.*, 1997)

que venham a impossibilitar a execução de comportamentos que fornecem os parâmetros para avaliação da atividade ansiolítica.

Mais especificamente, com o teste da barra giratória é possível avaliar a integridade do sistema motor, uma vez que o animal é desafiado a permanecer sobre uma barra que gira a uma velocidade fixa (5 rpm); enquanto que no campo aberto, o animal é colocado numa caixa dividida por quadrantes desenhados no fundo, onde pode percorrer livremente durante o tempo do teste, e sua atividade locomotora e exploratória é avaliada, dentre outros parâmetros, pelo número de quadrantes percorridos.

Embora os modelos comportamentais utilizados para estudar a atividade ansiolítica sejam indispensáveis na pesquisa pré-clínica de novas drogas com atividade ansiolítica (RODGERS *et al.*, 1997), ainda não se desenvolveu um modelo ideal que permita reproduzir comportamentos associados a esse transtorno e que não esteja intimamente ligado a outros tipos de comportamentos não relacionados (GUIMARÃES, 1993; RODGERS *et al.*, 1997). Por exemplo, o teste do labirinto em cruz elevado é um teste validado farmacologicamente como modelo experimental sensível a drogas ansiolíticas (PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW & FILE, 1986) – frequentemente, os da classe de benzodiazepínicos – mas seus resultados são influenciados pela atividade locomotora (ALMEIDA, 2006).

Desse modo, a predição do potencial farmacológico de uma determinada droga não pode depender de apenas um modelo experimental. Por esse motivo,

utilizam-se protocolos que reúnem vários testes comportamentais (VAN GAALLEN & STECKLER, 2000), numa tentativa de refinar a observação do comportamento animal, que será utilizado como parâmetro para a avaliação dos efeitos da droga em estudo. Além disso, existem tentativas recentes de agrupar vários modelos de atividade ansiolítica em um só aparato (RAMOS *et al.*, 2008), mostrando que a possibilidade de avaliação simultânea dos múltiplos aspectos que envolvem o transtorno de ansiedade é uma preocupação dos pesquisadores da área.

1.3 MODELOS COMPORTAMENTAIS DE ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA

Os modelos comportamentais que avaliam a atividade antidepressiva mais utilizados têm como base dos processos neurais o conflito entre o estresse psíquico e motor e a inibição do comportamento motivado positivamente para combater essa situação estressogênica (PORSOLT *et al.*, 1978; STONE, LIN & QUARTERMAIN, 2008).

Existem poucos modelos animais comportamentais para a avaliação da atividade antidepressiva, porém, são testes de altíssimo valor na experimentação pré-clínica, e um deles muito utilizado é o teste do nado forçado de Porsolt (PORSOLT, BERTIN & JALFRE, 1977). Nesse teste, o roedor é forçado a nadar num recipiente contendo água em um nível tal qual não é possível encostar a cauda ou as patas no fundo sem submergir, além de não haver como

escapar desse recipiente pelas laterais. Em determinado momento, o animal se defronta com o conflito entre o estresse físico gerado pela natação e a motivação para continuar tentando a fuga. No momento em que esse estresse físico ultrapassa a motivação para a tentativa de fuga, o animal adquire uma postura imóvel característica, boiando na superfície da água. Nesse contexto, o tempo total de imobilidade é o indicador da atividade antidepressiva, ou seja, quanto menor o tempo de imobilidade, maior será o efeito antidepressivo da substância estudada.

A modificação desse teste, proposta por Cryan, Valentino e Lucki (2005) refina a aquisição dos dados gerados pelo procedimento. Enquanto no modelo mais antigo, apenas o comportamento de imobilidade é medido, o modificado propõe a classificação do comportamento ativo exercido durante o período de mobilidade, distinguindo entre o comportamento de nadar ou de escalar a parede do recipiente. Esta distinção parece fornecer informações preditivas a respeito do mecanismo de ação do antidepressivo que promove a redução do tempo de imobilidade. Assim, animais pré-tratados com drogas que apresentam seletividade por vias noradrenérgicas tendem a exercer com maior frequência o comportamento de escalar a parede do recipiente, enquanto drogas com seletividade por vias serotoninérgicas tendem a elevar a frequência do comportamento de nadar.

Outro teste sensível a drogas antidepressivas é o da suspensão pela cauda (STERU, 1985), no qual o animal também apresenta comportamento de

imobilidade após tentativas de fuga sem sucesso. Esse teste tem uma característica importante que não se encontra nos supracitados, o de evitar o risco de hipotermia por não submergir o animal em água (DEUSSING, 2006). Além disso, é um teste prático, pois, não necessita de treino, e o efeito de drogas antidepressivas clássicas é observado após o tratamento agudo.

1.4 EXPERIÊNCIA PRÉVIA E BATERIA SEQUENCIAL

Sabe-se que experiências prévias dos animais podem interferir nos parâmetros avaliados, ainda que sejam expostos ao mesmo procedimento experimental (LISTER, 1990; RODGERS, 1993; FILE, 2001). E mais, alguns trabalhos indicam que alguns modelos provocam influência ou interferência em outros modelos nos quais o animal é subsequentemente exposto. Por exemplo, Andreatini e Bacellar (1999) mostraram que o teste do nado forçado de Porsolt tem uma importante influência ansiogênica no teste do labirinto em cruz elevado, e esse efeito é encontrado até mesmo após uma semana de exposição, mas, o inverso não ocorre. Isso nos mostra que a ordem dos procedimentos de uma bateria pode ser fundamental para a utilização adequada do mesmo animal na pesquisa comportamental.

Apesar desses estudos, não está ainda estabelecida uma sequência de procedimentos que possa ser aplicada com segurança em um mesmo animal, especialmente, quando se refere ao estudo de atividade ansiolítica e

antidepressiva. Por isso, a sucessão de procedimentos experimentais utilizando um mesmo animal deve ser feita com muita cautela para evitar interferências não controladas no comportamento estudado.

1.5 ÉTICA EXPERIMENTAL E RENDIMENTO DE PRODUTOS NATURAIS

Existem fortes argumentos para o estabelecimento de uma bateria sequencial de procedimentos experimentais onde os mesmos animais possam ser reutilizados para aquisição de novos dados.

Um deles refere-se aos aspectos éticos que direcionam as pesquisas para o uso de uma quantidade cada vez menor de animais de experimentação. Se, por um lado, é importante testar um novo composto farmacológico em diferentes procedimentos experimentais na tentativa de refinar o conhecimento de seu perfil farmacológico, por outro, deve-se, com razão, restringir o número de animais utilizados, extraindo de cada um deles a maior quantidade possível de informação.

Além desse aspecto, existe outro, de caráter mais prático, que direciona os protocolos experimentais para a utilização múltipla de cada animal de experimentação tratado com a substância em estudo. A pesquisa de novos compostos farmacologicamente ativos encontra nas plantas medicinais uma fonte abundante de protótipos (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001), incluindo substâncias com ação importante sobre o sistema nervoso central. A

biodiversidade vegetal apresenta, ainda, um grande potencial para fornecer substâncias com capacidade de interferir em processos crônicos como ansiedade e depressão, além de outros, que não respondem bem aos tratamentos convencionais (PHILLIPSON, 2001; CARLINI, 2003; ERNST, 2007). No entanto, o rendimento dos extratos de plantas e óleos essenciais – brutos ou frações obtidas desses extratos – nem sempre atinge a quantidade ideal para testes em diferentes modelos experimentais, indispensável para o traçado preciso do perfil farmacológico do composto em estudo. Desse modo, a idéia de submeter o mesmo animal tratado com um extrato, frações ou compostos isolados, a testes sequenciais contribuiria para um estudo mais completo destas preparações.

O conhecimento da possibilidade de exposições múltiplas com o mesmo animal – e dos efeitos que isso pode promover no comportamento do roedor – contribuirá para o aumento da quantidade de informações científicas obtidas sem aumentar a demanda do número de animais. Esta é uma área que vem recebendo renovada atenção devido ao constante assédio da sociedade – civil e científica – no sentido de reduzir o uso de animais de experimentação. Logo, diante dessa preocupação ética na experimentação animal e das dificuldades de obter rendimento suficiente das substâncias extraídas de produtos naturais, bem como o aperfeiçoamento dos procedimentos experimentais, tanto para depressão como para ansiedade, chega-se aos objetivos deste estudo.

2 OBJETIVOS

- Determinar possíveis interferências da pré-exposição a um procedimento experimental sobre os parâmetros avaliados no procedimento subsequente, em modelos comportamentais para a avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongos.
- Propor uma bateria sequencial de procedimentos válida para a otimização dos protocolos padrão utilizados na pesquisa pré-clínica em ansiedade e depressão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUJEITOS DA PESQUISA

Foram utilizados camundongos suíços machos provenientes do Biotério Central da UNESP – campus de Botucatu, com idades entre 43 a 47 dias. Os animais foram mantidos por duas semanas no biotério do departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, antes dos procedimentos experimentais, em salas com temperatura (de 21 a 22 °C) e ciclo claro-escuro (12 h) controlados, com água fresca e comida *ad libitum* até 2 horas antes do início dos procedimentos. Os animais foram colocados em uma gaiola numa sala subjacente à sala de teste de 1,5 a 2 horas antes de cada procedimento para habituação.

3.2 ESCOLHA DOS MODELOS COMPORTAMENTAIS

Dentre os vários modelos comportamentais sensíveis a drogas ansiolíticas e antidepressivas, foram escolhidos testes práticos e de execução rápida. Assim, foram preteridos testes com mais de um dia de experimentação e/ou que precisassem de pré-seleção dos animais, já que esta poderia ser mais um fator de estresse interferente em outros procedimentos. Além disso, era preciso haver testes com tempos de observação semelhantes, para otimizar a utilização dos

aparatos e equipamento de aquisição de imagem. Com base nesses critérios, foram escolhidos os testes da caixa-claro escuro, do campo aberto, do labirinto em cruz elevado e o da suspensão pela cauda.

3.3 MODELOS PARA ANÁLISE COMPORTAMENTAL

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO – LCE

O LCE, validado para camundongos por Lister (1987), consiste numa plataforma com dois braços abertos (BA) perpendiculares a dois braços fechados (BF). Cada braço mede 30 cm de comprimento x 5 cm de largura, e os braços fechados, possuem paredes com 15 cm de altura; o conjunto foi instalado a 50 cm do solo, sob uma lâmpada eletrônica fluorescente (20 W) em uma sala com som externo atenuado. O protocolo experimental consiste em colocar o animal no centro do labirinto com o focinho voltado para um dos braços abertos, sendo-lhe permitido explorar livremente o aparato por 5 minutos, durante os quais são registrados os seguintes parâmetros: tempo de permanência nos braços abertos e fechados, número de entradas nos braços abertos (parâmetros de ansiedade), tempo de permanência na plataforma central (avaliação de risco), tempo de permanência nos braços fechados e número de empinadas (*rearing*), no qual o animal se ergue, apoiando-se sobre as patas traseiras (parâmetros de atividade locomotora e exploratória). Dentre os parâmetros apresentados, os principais para a avaliação da atividade ansiolítica são o tempo de permanência e o número

de entradas nos BA, enquanto os parâmetros de atividade locomotora são considerados secundários. Os animais que escorregaram ou saltaram do aparato foram excluídos da análise.

CAIXA CLARO-ESCURO – CCE

O aparato da CCE (CRAWLEY, 1981) é composto por uma caixa com dimensões exteriores de 46 x 27 x 30 cm (comprimento x largura x altura) dividida em dois compartimentos: um menor, com 1/2 da área do maior, com paredes pretas e uma tampa escura sobre a abertura superior; e um maior, com 2/3 da dimensão da caixa, com paredes brancas e iluminação direta de uma lâmpada eletrônica fluorescente de 20 W. Os dois compartimentos são separados por uma divisória preta, do tipo guilhotina, com uma porta central de 7,5 x 7,5 cm, ao nível do chão. Cada camundongo é colocado individualmente no centro da parte iluminada, de frente para a abertura que leva ao lado escuro da caixa, sendo-lhe permitido explorar livremente os dois compartimentos durante 5 minutos, após a primeira entrada no compartimento escuro. Foi registrado e analisado o comportamento de empinar (já descrito para o LCE), parâmetros de ansiedade como o tempo de permanência no compartimento claro e escuro, a latência para a primeira entrada no lado claro após o início do teste e o número de transições entre os compartimentos (atividade locomotora). Dos parâmetros apresentados, apenas o tempo de permanência no compartimento claro é

considerado parâmetro principal para a avaliação da atividade ansiolítica. Os demais parâmetros são considerados secundários.

CAMPO ABERTO – CPA.

O teste do CPA (WALSH & CUMMINS, 1976) consiste de um tipo de caixa circular construída em acrílico branco com 50 cm de diâmetro e parede de 40 cm de altura, sobre a qual se localiza uma lâmpada eletrônica de 20 W. O piso desse campo é dividido por duas linhas concêntricas (10 e 20 cm de raio) e linhas radiais formando 19 segmentos de áreas semelhantes. Os animais foram colocados individualmente no centro da caixa, onde permaneceram durante 5 minutos em movimentação livre. Foram registrados os parâmetros de tempo de permanência no centro (área central de 30 cm de diâmetro) e na periferia (área entre a parede e 10 cm distante dela), frequência de transições entre centro e periferia (parâmetros de ansiedade), número de empinadas e quadrantes percorridos (atividade locomotora e exploratória).

SUSPENSÃO PELA CAUDA – SPC

O teste da SPC consiste em suspender o animal, prendendo a cauda com auxílio de uma fita adesiva a 1 cm de sua ponta, numa armação de madeira a 50 cm do assoalho (STERU *et al.*, 1985). O animal é observado por 5 minutos, e são registrados o tempo total de imobilidade e a latência para a primeira manifestação desse comportamento, parâmetros de atividade antidepressiva.

3.4 GRUPOS DE COMPARAÇÃO

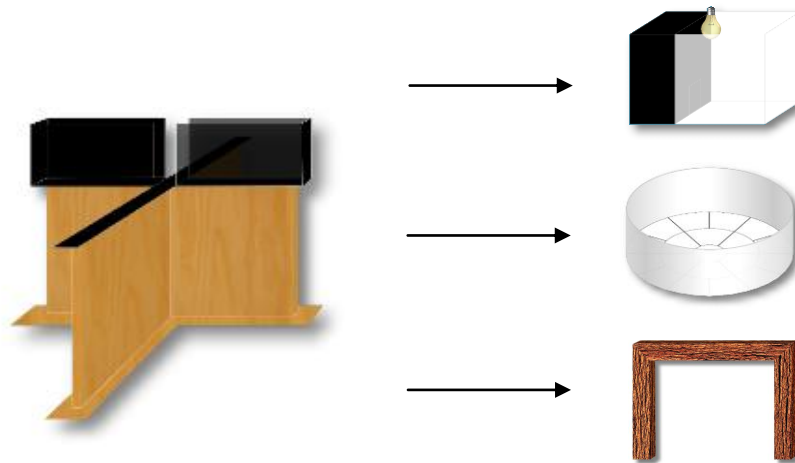
Este trabalho foi dividido em duas partes: Experimento 1, no qual se pode estabelecer possíveis interferências da pré-exposição (P-E) a um procedimento sobre os parâmetros avaliados no procedimento subsequente; e Experimento 2, uma bateria sequencial que mantivesse os parâmetros avaliados inalterados com o procedimento prévio. Nos dois experimentos, todos os aparatos foram limpos com álcool a 10% antes da submissão de cada animal; e entre cada procedimento, os animais permaneceram nas gaiolas de habituação, em uma sala adjacente à sala de teste.

3.4.1 EXPERIMENTO 1

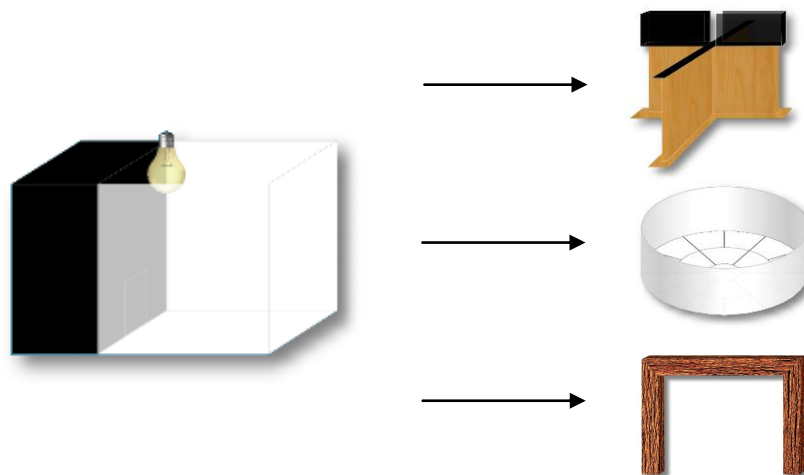
As comparações previstas nesse experimento envolvem a exposição de um grupo de camundongos a dois diferentes modelos experimentais, com intervalo de 30 minutos entre as exposições. Desse modo, são feitas as devidas comparações entre um grupo com P-E a um dos modelos e um grupo controle (CTL) não submetido à P-E.

Foram realizados os procedimentos que possibilitam a avaliação da interferência da P-E sobre os comportamentos medidos nos modelos do LCE, CPA, CCE ou SPC, como é mostrado a seguir:

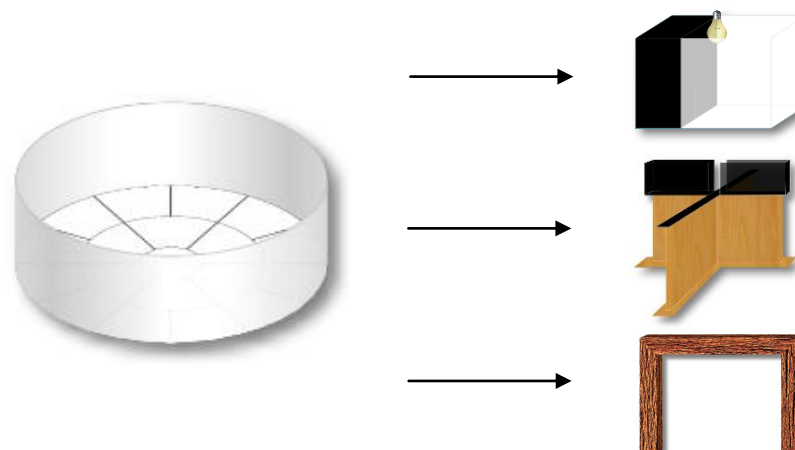
a) Interferência da P-E ao LCE em comportamentos medidos na CCE, CPA e SPC;



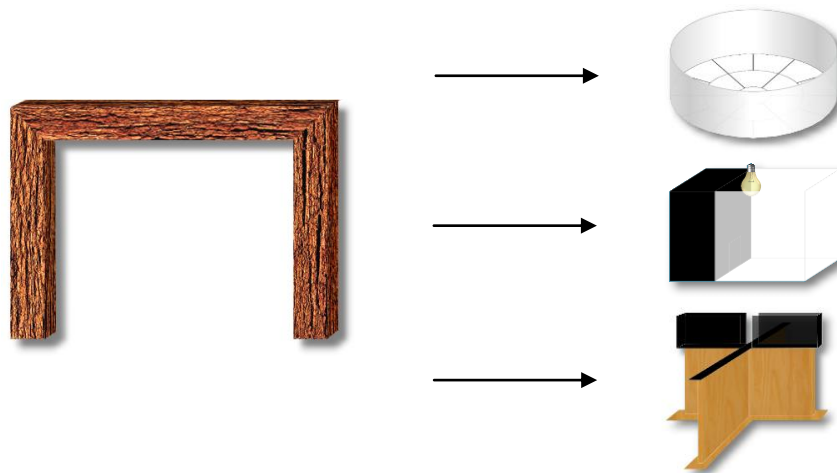
b) Interferência da P-E à CCE em comportamentos medidos no LCE, CPA e SPC;



c) Interferência da P-E ao CPA em comportamentos medidos no CCE, LCE e SPC;



d) Interferência da P-E ao SPC em comportamentos medidos no CPA, CCE e LCE.



3.4.2 EXPERIMENTO 2

Com base nos resultados obtidos no Experimento 1, foi proposta uma bateria com 3 dos 4 modelos estudados, com o objetivo de avaliar a resposta de animais tratados com as drogas padrão de cada procedimento em relação a seus respectivos veículos. Os parâmetros que justificam a escolha dos modelos e sua sequência de aplicação são considerados no item Resultados e Discussão.

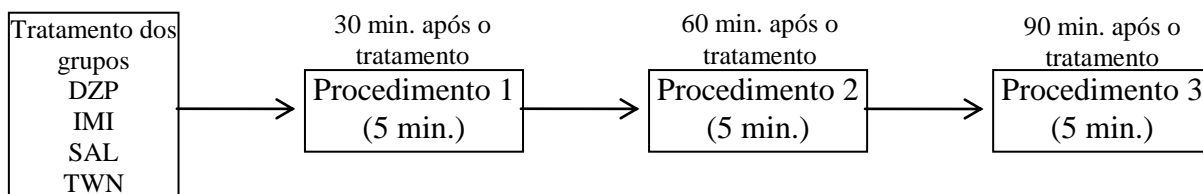
3.4.4.1 Drogas e Tratamentos

Trinta minutos antes do primeiro procedimento da bateria sequencial, grupos de animais foram submetidos a um dos 4 tratamentos descritos a seguir: diazepam (DZP - 2 mg/kg), imipramina (IMI - 30 mg/kg), salina (SAL - 0,09%) e tween® (TWN - 0,01%). Todas as concentrações foram ajustadas para um

volume de 10 mL/kg corporal. O DZP e a IMI foram solubilizadas em SAL e administradas por via intraperitoneal (i.p.). O grupo que recebeu SAL também foi administrado por via i.p., enquanto o grupo que recebeu TWN, por via oral.

O TWN é um solubilizante utilizado em preparações de extratos e óleos essenciais obtidos de plantas e foi administrado pela via oral por ser esta a via preferencialmente utilizada para o estudo de preparações originadas de produtos naturais. A utilização de dois grupos tratados com veículos diferentes tornará possível a investigação do possível efeito *per se* do TWN.

Todos os grupos de animais foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, desde a manipulação até a submissão à seguinte bateria sequencial: 5 minutos no teste do CPA após 30 minutos do tratamento; 5 minutos no teste da CCE após 60 minutos do tratamento; e 5 minutos no teste da SPC após 90 minutos do tratamento.



3.5 REGISTRO E ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Em todos os procedimentos, a atividade desenvolvida pelo animal foi gravada, via captura de vídeo, e armazenada em um micro computador; e a quantificação dos parâmetros comportamentais, auxiliada pelo software EthoLog v.2.2.5 ©. (Ottoni, 2000).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão apresentados como mediana e intervalo entre o primeiro quartil (Q1) e o terceiro quartil (Q3). A análise estatística dos resultados do Experimento 1 foi feita com a utilização do teste de Mann-Whitney, com comparações entre os grupos independentes submetidos ou não à P-E. No Experimento 2, foi utilizada a análise de variância ANOVA não-paramétrica (Kruskal-Wallis), seguida do teste de Mann-Whitney quando necessário. Em todos os casos foram consideradas significantes as diferenças relacionadas a $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1

A seguir, são apresentados os resultados obtidos da comparação entre os grupos de animais submetidos a um modelo experimental com P-E a um dos outros modelos e seus respectivos grupos CTLs, os quais foram submetidos apenas ao modelo experimental referido na tabela.

Nas tabelas 1, 2 e 3, são apresentados os resultados dos parâmetros avaliados em diferentes procedimentos após a exposição ao LCE. Na tabela 1, são apresentados resultados obtidos no teste da CCE, na tabela 2, os obtidos no do CPA e na tabela 3, no da SPC.

Tabela 1 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos na CCE com a interferência da P-E ao LCE

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao LCE (n = 10)
Tempo no compartimento claro (s)	74(25-86)	74(59-106)
Latência (s) #	42(28-48)	39(21-64)
Número de empinadas/min.	10(8-12)	13(12-15) *
Transição claro-escuro	12(8-14)	13(12-20)

* = $p \leq 0,05$, relativo ao respectivo CTL

Latência para a primeira entrada no compartimento claro

Tabela 2 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no CPA com a interferência da P-E ao LCE

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao LCE (n = 10)
Tempo na área central (s)	48(39-62)	38(25-53)
Número de empinadas	41(30-55)	23(8-35) *
Número de quadrantes	176(149-190)	110(76-177)
Transição centro-periferia	32(27-36)	18(11-28)

* = $p \leq 0,05$, relativo ao respectivo CTL.

Tabela 3 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no SPC com a interferência da P-E ao LCE

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao LCE (n = 10)
Tempo de imobilidade (s)	139(85-174)	112(64-115)
Latência #	44(22-51)	54(40-66)

Latência para o primeiro comportamento de parar

A pré-exposição ao LCE aumentou ($p = 0,0271$) o número de empinadas dos animais na CCE (Tabela 1) e diminuiu ($p = 0,0343$) o desempenho desse comportamento no CPA (Tabela 2). A P-E ao LCE não modificou os outros parâmetros analisados, embora tenha sido possível observar uma tendência em diminuir ($p = 0,0630$) o número de transições entre centro e periferia no CPA. Também, nenhuma interferência importante foi detectada nos parâmetros analisados no teste do SPC, embora a P-E ao LCE tenha mostrado uma tendência em diminuir ($p = 0,0892$) o tempo de imobilidade (Tabela 3). Nas tabelas seguintes, são apresentados os resultados dos parâmetros avaliados em diferentes procedimentos após a exposição à CCE. Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos no teste do LCE, na tabela 5, os obtidos no do CPA, e na tabela 6, os obtidos no da SPC.

Tabela 4 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no LCE com a interferência da P-E à CCE.

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E à CCE (n = 10)
Tempo no compartimento central (%)	12(7-18)	10(3-17)
Tempo nos BA (%)	1(0-5)	0(0-1)
Tempo nos BF (%)	99(95-100)	100(99-100)
Número de empinadas	24(21-31)	14(6-20) *
Entradas no BA	0(0-1)	0(0-1)
Entradas no BF	9(6-12)	7(3-10)

* = $p \leq 0,05$, relativo ao respectivo CTL.

Tabela 5 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no CPA com a interferência da P-E à CCE

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E à CCE (n = 10)
Tempo na área central (s)	70(45-97)	38(31-56)
Número de empinadas	42(28-49)	26(13-39) *
Número de quadrantes	124(113-158)	137(94-172)
Transição centro-periferia	33(28-38)	32(10-37)

* = $p < 0,05$, relativo ao respectivo CTL.

Tabela 6 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no SPC com a interferência da P-E ao CCE

Parâmetros	CTL (n = 8)	P-E ao LCE (n = 10)
Tempo de imobilidade (s)	103(72-127)	92(73-143)
Latência #	49(32-85)	56(50-69)

Latência para o primeiro comportamento de parar

A P-E à CCE diminuiu o número de empinadas tanto no LCE ($p = 0,0126$) quanto no CPA ($p = 0,0493$), como mostram as tabelas 3 e 4, respectivamente. Não foram observadas outras alterações significantes nesse mesmo procedimento. Também, nenhuma interferência importante foi detectada nos parâmetros medidos no teste do SPC (Tabela 6).

Nas tabelas seguintes, são apresentados os resultados dos parâmetros avaliados em diferentes procedimentos após a exposição ao teste do CPA. Na tabela 7 são apresentados resultados obtidos no da CCE, na tabela 8, no do LCE, e na tabela 9, os parâmetros obtidos no da SPC.

Tabela 7 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no CCE com a interferência da P-E ao CPA

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao CPA (n = 10)
Tempo no compartimento claro (s)	48(36-96)	85(36-129)
Latência (s) #	38(31-71)	38(28-91)
Número de empinadas/min.	6(4-10)	8(4-11)
Número de transições claro-escuro	11(7-16)	14(10-18)

Latência para a primeira entrada no compartimento claro

Tabela 8 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no LCE com a interferência da P-E ao CPA

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao CPA (n = 10)
Tempo no compartimento central (%)	14(8-19)	20(14-29)
Tempo nos BA (%)	0(0-0)	0(0-2)
Tempo nos BF (%)	100(100-100)	100(98-100)
Número de empinadas	16(11-20)	14(7-16)
Número de entradas no BA	0(0-0)	0(0-1)
Número de entradas no BF	6(3-8)	8(7-12)

Tabela 9 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no SPC com a interferência da P-E ao CPA

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao LCE (n = 10)
Tempo de imobilidade (s)	116(83-156)	147(136-161)
Latência #	40(26-66)	58(40-76)

Latência para o primeiro comportamento de parar

Como pode ser observado nas tabelas, não foi observada alteração significativa nos parâmetros analisados no LCE, na CCE ou no teste de SPC após a P-E dos animais ao CPA.

Nas próximas três tabelas, é mostrado o resultado da análise dos parâmetros observados no teste do CPA (Tabela 10), CCE (Tabela 11) e LCE (Tabela 12), após a P-E ao SPC.

Tabela 10 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos na CPA com a interferência da P-E ao SPC

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao SPC (n = 9)
Tempo na área central (s)	64(52-106)	59(37-108)
Número de empinadas	32(28-25)	28(18-45)
Número de quadrantes	144(110-156)	111(101-172)
Transição centro-periferia	32(22-38)	25(18-36)

Tabela 11 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no CCE com a interferência da P-E ao SPC

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao SPC (n = 9)
Tempo no compartimento claro (s)	80(69-96)	37(16-113)
Latência (s) #	36(27-108)	25(20-35)
Número de empinadas/min.	41(18-40)	47(0-51)
Número de transições claro-escuro	12(11-20)	9(5-13)

Latência para a primeira entrada no compartimento claro

Tabela 12 - Mediana (Q1-Q3) dos parâmetros medidos no LCE com a interferência da P-E ao SPC

Parâmetros	CTL (n = 10)	P-E ao SPC (n = 10)
Tempo no compartimento central (%)	10(7-19)	16(9-19)
Tempo nos BA (%)	0(0-3)	0(0-2)
Tempo nos BF (%)	100(97-100)	100(98-100)
Número de empinadas	14(10-18)	15(12-18)
Número de entradas no BA	0(0-1)	0(0-1)
Número de entradas no BF	10(8-12)	9(6-11)

Como mostram as tabelas acima, não foram observadas alterações significantes como resultado da P-E ao SPC nos parâmetros analisados nos diferentes procedimentos.

Na avaliação da interferência da P-E nos experimentos subsequentes, observou-se que, embora a P-E de um modelo qualquer não interfira nos principais parâmetros de cada experimento, deve-se considerar que as alterações nos parâmetros secundários também são relevantes para uma análise completa do comportamento animal. Portanto, qualquer alteração em alguns dos parâmetros analisados – principais ou secundários – foi considerada suficiente para a exclusão dos procedimentos e/ou o estabelecimento de sua ordem na bateria sequencial.

A P-E ao teste do LCE alterou, embora de modo distinto, o comportamento de empinar dos animais quando submetidos ao da CCE e ao do CPA. Enquanto na CCE esse parâmetro foi aumentado, no CPA ele foi diminuído (tab. 1 e 2). Ainda, a P-E ao LCE mostrou uma tendência em diminuir o tempo de

imobilidade dos animais analisados no teste SPC (tab. 3). Por tanto, se a P-E dos animais ao LCE interfere de alguma maneira no comportamento dos camundongos, isso indica que a incorporação desse procedimento à bateria sequencial possa comprometer, de modo imprevisível, os resultados obtidos. Além disso, outro fator que dificulta a análise dos resultados no LCE é a frequência com a qual se observou valores muito baixos (próximos ou iguais a zero) em parâmetros importantes como o tempo e número de entradas nos braços abertos. Por esses motivos, o LCE foi excluído da bateria sequencial de procedimentos do Experimento 2.

A P-E à CCE interferiu no comportamento de empinar dos animais no LCE e no CPA (tab. 3 e 4), indicando ser inadequada a sua utilização como primeiro procedimento da bateria sequencial. Contudo, esse procedimento poderia ser disposto antes do SPC, visto que não apresentou interferência nos parâmetros medidos neste último teste.

Por outro lado, a P-E ao CPA não interferiu nos comportamentos analisados no teste da CCE ou no do LCE (tab. 5 e 6), bem como nos analisados no do SPC (tab. 7). Por isso, o teste do CPA foi disposto como primeiro procedimento experimental da bateria sequencial.

A definição da ordem de aplicação dos outros modelos teve como base o fato de que os modelos comportamentais para a avaliação da atividade antidepressiva apresentam um conflito entre o estresse psíquico-motor e o comportamento motivado positivamente, na tentativa de escapar de uma

situação desconfortável (PORSOLT *et al.*, 1978; STONE, LIN & QUARTERMAIN, 2008), e ainda, com indícios de que esse conflito motivacional pode ter um efeito ansiogênico (ANDREATINI & BACELLAR, 1999). Diante disso, o teste da SPC foi estabelecido como último procedimento experimental na bateria sequencial, apesar de não terem sido observadas alterações importantes decorrentes da P-E a esse teste nos parâmetros avaliados no CPA, CCE e LCE.

Cabe ressaltar a dificuldade da análise dos resultados do LCE, pelos dados muito próximos a zero nos parâmetros de ansiedade, que não permitiu uma avaliação adequada da possível atividade ansiogênica da P-E ao SPC.

Essas considerações justificam o estabelecimento da seguinte ordem na bateria sequencial de procedimentos: CPA, CCE e SPC.

4.2 EXPERIMENTO 2

Os grupos de animais foram tratados com DZP, IMI, SAL ou TWN e submetidos à bateria sequencial estabelecida: CPA, CCE, e SPC. Nas figuras abaixo, são apresentados os resultados obtidos da análise comportamental dos grupos tratados com os veículos (SAL e TWN) e dos tratados com as drogas-padrão, para o respectivo modelo experimental, ou seja, DZP para o teste da CCE e IMI, para o da SPC. Como os animais tratados com essas substâncias foram submetidos à bateria, foram gerados resultados em procedimentos para os

quais o DZP e a IMI não são considerados drogas-padrão. Esses resultados também são apresentados a seguir.

Na Figura 1, os resultados obtidos dos parâmetros analisados no CPA, primeiro procedimento da bateria.

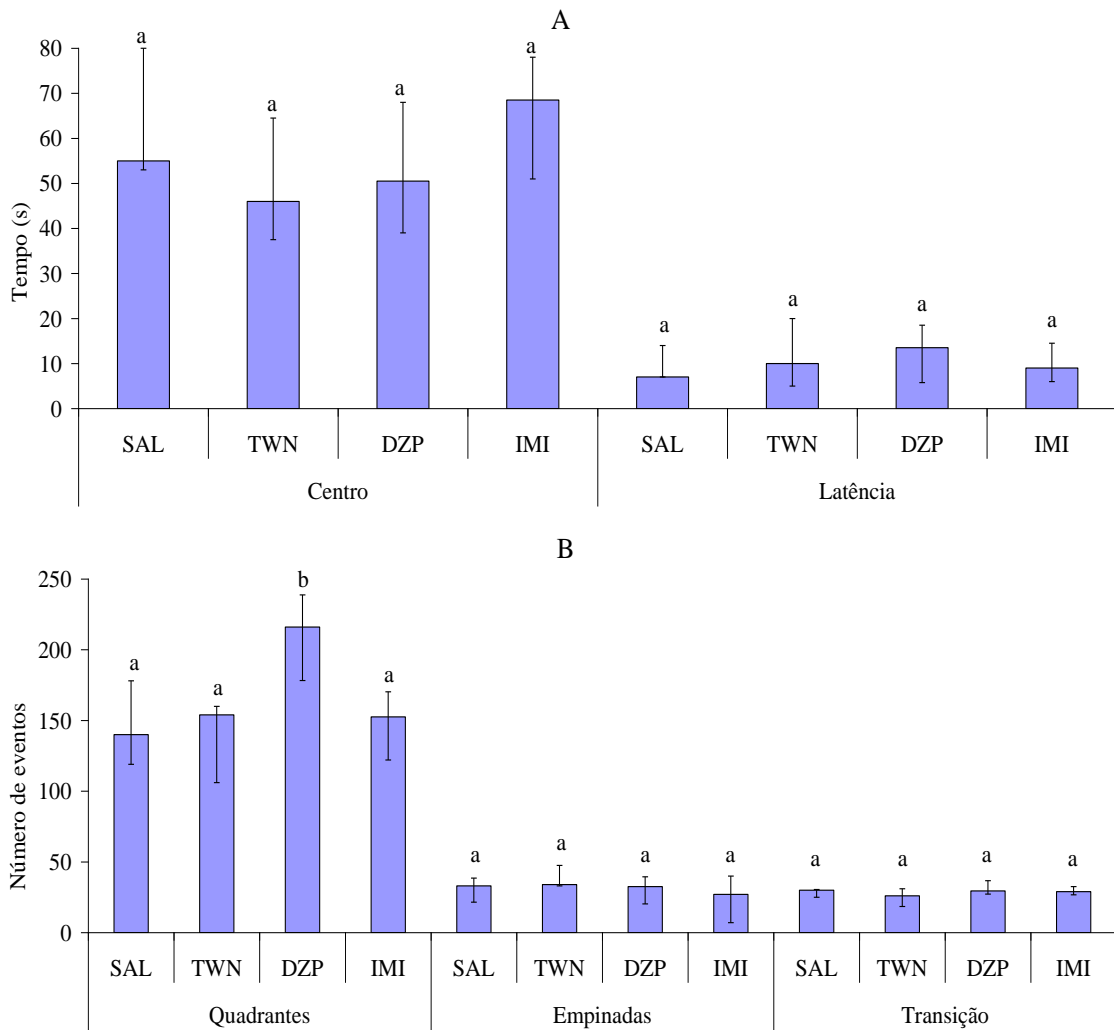


Figura 1. Resultados obtidos do CPA (mediana e intervalo Q1-Q3). Em **A**, tempo total de permanência no centro e latência para a 1ª entrada na periferia; em **B**, frequência de quadrantes percorridos, número total de empinadas e de transição entre centro e periferia. SAL (n = 7), TWN (n = 7), DPZ (n = 8) e IMI (n = 8). Grupos identificados com letras iguais em cada parâmetro avaliado não mostram diferenças significantes entre si; letras diferentes indicam que $p \leq 0,05$.

No teste do CPA, não houve diferença significativa no tempo total de permanência no centro nem na latência para a primeira entrada na periferia entre os grupos (Figura 1, A). Também, não foram encontradas quaisquer alterações significantes no número de empinadas ou de transições entre centro e periferia. Entretanto, houve um aumento significativo na frequência de quadrantes percorridos pelo grupo DZP em relação aos outros grupos (Figura 1, B).

Sabe-se que os resultados obtidos no teste do CPA são sujeitos a alterações decorrentes da ação de drogas psicoativas, tanto as depressoras, como as excitantes do sistema nervoso central. Essas alterações são identificadas, *a priori*, pela alteração da atividade locomotora do animal (WALSH & CUMMINS, 1976). Sendo assim, esse modelo não exige uma droga-padrão preditiva da atividade esperada, pois, tem como objetivo primário a identificação de possíveis alterações locomotoras, as quais podem indicar uma neurotoxicidade, que as substâncias sintéticas ou naturais estudadas possam provocar.

Neste estudo, a administração de DZP aumentou o número de quadrantes percorridos (fig. 1, B), como já foi visto em trabalhos anteriores, ainda que o DZP não tenha provocado efeitos significantes sobre o comportamento de empinar (CHOLERIS *et al.*, 2001). O aumento do número de quadrantes provocado com a administração de DZP pode estar relacionado com uma diminuição da ansiedade, ou pelo aumento da atividade exploratória. Nesse contexto, o procedimento utilizado neste estudo se mostrou eficiente para avaliar

a atividade locomotora na bateria sequencial, pois, foi possível detectar as alterações previstas para o DZP.

Na Figura 2, são mostrados os resultados obtidos dos parâmetros analisados no CCE, segundo procedimento da bateria.

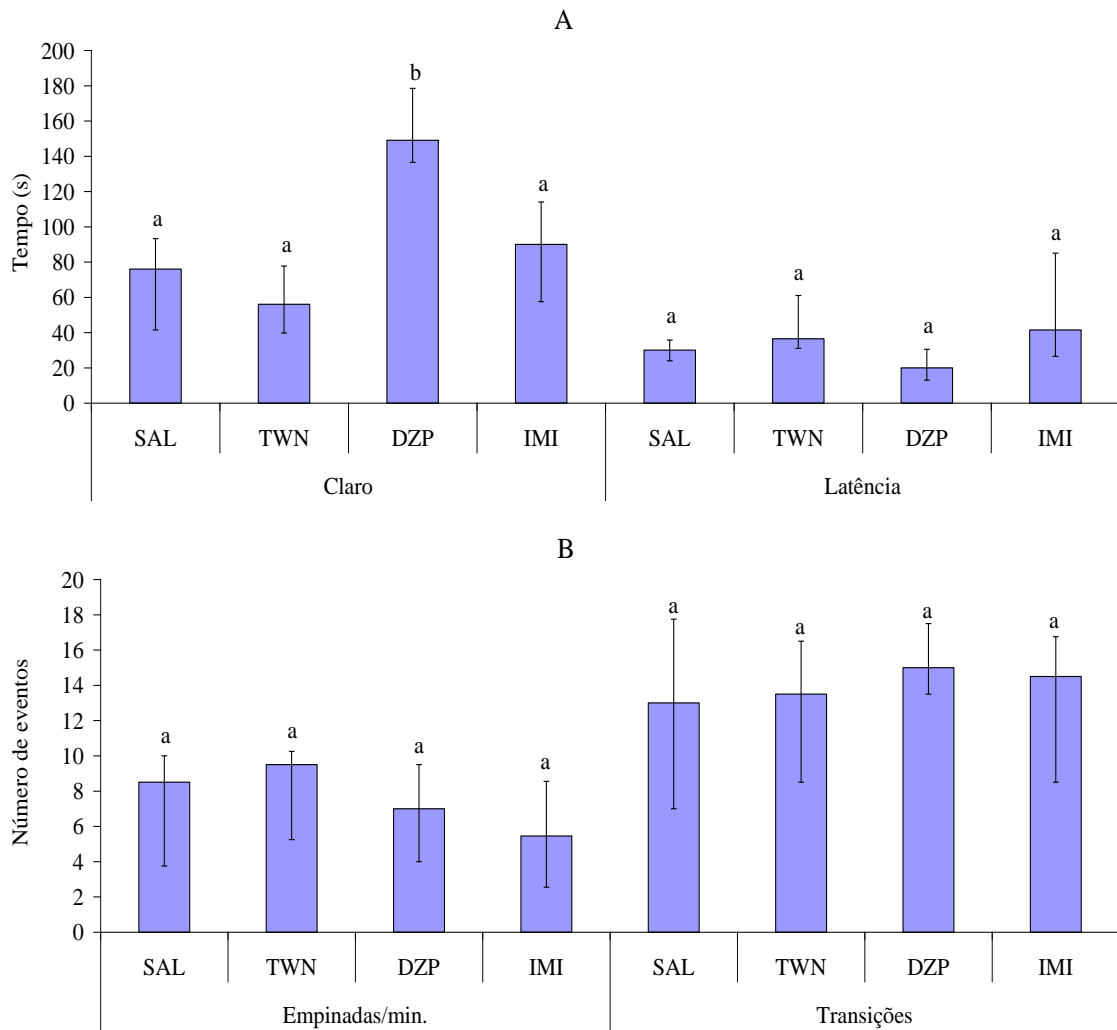


Figura 2. Resultados obtidos da CCE como mediana (Q1-Q3). Em **A**, tempo de permanência no compartimento claro e latência para a 1ª entrada nesse compartimento; e em **B**, frequência de transições entre os compartimentos e empinadas/min para os grupos SAL (n = 8), TWN (n = 8), DPZ (n = 7) e IMI (n = 7). Grupos identificados com letras iguais em cada parâmetro avaliado não mostram diferenças significantes entre si; letras diferentes indicam que $p \leq 0,05$.

O grupo DZP apresentou um aumento significativo do tempo total de permanência no compartimento claro da CCE quando comparado com os demais grupos; e não alterou a latência para a primeira entrada no compartimento claro (Figura 2, A). Nesse mesmo procedimento, não houve alterações significativas na frequência de empinadas e de transições entre os compartimentos (Figura 2, B). A IMI não apresentou diferença significativa nos parâmetros analisados.

Uma consideração importante é que a medida do comportamento de empinar na CCE não pode ser quantificada por todo o período de observação, já que, nas nossas condições experimentais, essa medida não pode ser feita durante o período em que o animal permanece no compartimento escuro. Essa limitação torna a quantificação do comportamento de empinar dependente do tempo que o animal permanece no compartimento claro, que é diferente para cada animal; quanto menor esse tempo, menos representativa é a quantificação dos dados, motivo pelo qual os dados do número de empinadas na CCE foram apresentados em unidade relativa.

Nesse contexto, a medida desse parâmetro no CPA parece ser mais apropriada, pois, todos os animais podem ser observados durante todo o período de exposição.

O DZP é a droga, da classe dos benzodiazepínicos, mais comum como padrão nos trabalhos que utilizam o teste da CCE (BOURIN & HASCOËT, 2003). Além disso, Bourin e Hascoët mostraram em sua revisão diversas diferenças laboratoriais na execução desse procedimento, desde modificações no

próprio aparato até os parâmetros que são escolhidos para a análise comportamental. No entanto, apesar da grande variabilidade no protocolo experimental, o único parâmetro que é utilizado de modo consistente para a avaliação da atividade ansiolítica é o tempo total de permanência no compartimento claro. Na bateria sequencial deste trabalho, o DZP aumentou esse parâmetro (fig. 2, A), mostrando estar dentro das expectativas para um procedimento experimental válido para a avaliação da atividade ansiolítica.

Embora o teste do CPA também seja sensível a drogas com efeito ansiolítico, essa atividade do DZP observada no teste da CCE foi mais evidente, indicando ser o teste da CCE o procedimento mais adequado para a análise do efeito ansiolítico do material a ser estudado (plantas ou drogas desconhecidas). Por outro lado, a inclusão do CPA na bateria sequencial é indispensável, pois, mostrou uma grande eficiência em detectar alterações na atividade locomotora geral.

Na Figura 3, são mostrados, como mediana (Q1-Q3), os resultados obtidos dos parâmetros analisados no SPC, terceiro procedimento da bateria.

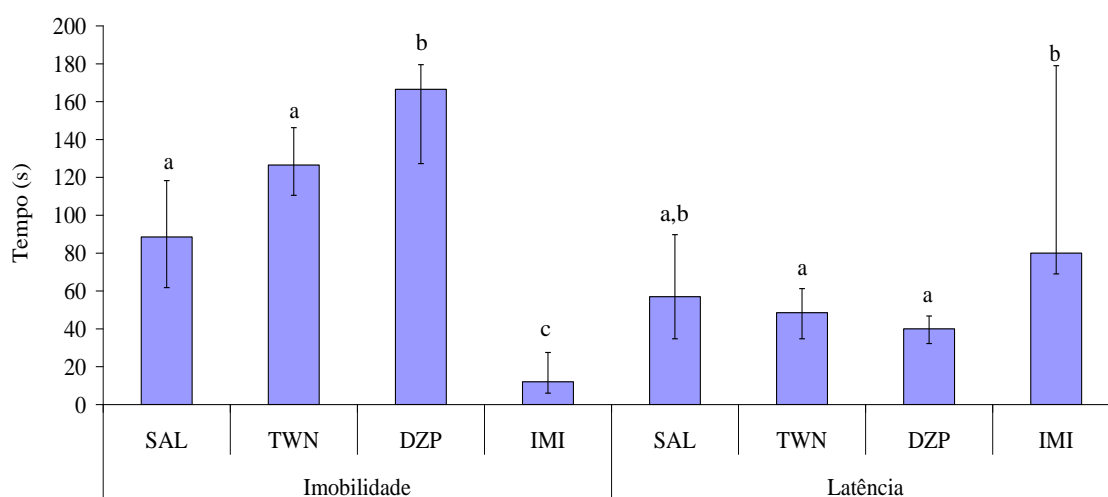


Figura 3. Resultados obtidos do SPC, em mediada (Q1-Q3). Tempo de imobilidade e latência para a 1ª parada para os grupos SAL (n = 6), TWN (n = 8), DZP (n = 8) e IMI (n = 8) no teste de SPC. Grupos identificados com letras iguais em cada parâmetro avaliado não mostram diferenças significantes entre si; letras diferentes indicam que $p \leq 0,05$.

No teste do SPC, o tratamento com IMI diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais em relação aos outros grupos (Figura 3). O resultado da latência para o primeiro comportamento de parar não foi tão evidente, já que o grupo tratado com IMI não apresentou diferença em relação ao tratado com SAL.

O teste do SPC é validado como modelo de atividade antidepressiva, essencialmente, baseado nos efeitos que os agentes clínicos antidepressivos apresentam (STERU *et al.*, 1985). Além disso, uma das vantagens desse modelo, em relação ao teste do nado forçado, é o de ser mais prático por ser um teste de execução rápida e por sua sensibilidade a tratamentos agudos (CRYAN, VALENTINO & LUCKI, 2002; CRYAN, MOMBÉREAU & VASSOUT,

2005). O procedimento do SPC mostrou ser eficiente em apontar o efeito antidepressivo da IMI na bateria sequencial proposta neste estudo.

Com isso, é notável que os procedimentos da bateria sequencial sejam válidos para a detecção da atividade ansiolítica e antidepressiva, bem como para a avaliação dos efeitos das substâncias estudadas na atividade exploratória e locomotora de camundongos.

Além disso, a reutilização do sujeito experimental com a aplicação dessa bateria sequencial reduziu em 67% o número de animais em relação ao uso tradicional dos procedimentos, no qual os animais não são reutilizados.

Numa bateria tradicional hipotética com 4 grupos experimentais (8 animais por grupo), seriam necessários 32 animais para cada procedimento experimental (CPA, CCE e SPC), somando um total de 96 animais. Na bateria sequencial, resultados comparáveis seriam obtidos com o uso de apenas 32 desses animais. É esperada também, a diminuição, na mesma proporção, da quantidade de substâncias utilizadas, pouco relevante em se tratando dos veículos (SAL e TWN), porém de grande importância na utilização de extratos ou óleos essenciais de plantas, bem como das drogas-padrão DZP e IMI.

Outrossim, em nenhum dos testes, o grupo tratado com o veículo TWN apresentou diferenças significantes quando comparado com o grupo tratado com SAL. Isso nos dá uma segurança para utilizar somente o TWN como controle negativo na aplicação da bateria proposta neste estudo, especialmente, quando a preparação de origem natural a ser testada for solubilizada com esse veículo.

6 CONCLUSÃO

- A pré-exposição de camundongos a um procedimento experimental pode interferir nos resultados obtidos em outro procedimento subsequente.
- Essa interferência pode ser evitada com um rearranjo adequado na ordem dos procedimentos utilizados
- Foi estabelecida a sequência CPA, CCE e SPC como proposta de uma bateria de procedimentos que pode ser utilizada para avaliar, tanto a atividade ansiolítica como antidepressiva de substâncias, bem como a atividade exploratória e locomotora de camundongos.
- Essa bateria sequencial possibilita diminuir a quantidade da substância utilizada, assim como o número de animais de experimentação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J.F.; FERNANDES, J.; ANDREOLI, S.B.; BUSNELLO, E.D. Estudo Multicêntrico de Morbidade Psiquiátrica em Áreas Urbanas Brasileiras (Brasília, São Paulo, Porto Alegre). *Revista ABP-APAL*, v. 14, n. 3, p. 93 – 104, 1992.
- ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J.F.; FERNANDES, J.; ANDREOLI, S.B.; BUSNELLO, E.D. Brazilian Multicentric Study of Psychiatric Morbidity – Methodological Features and Prevalence Estimates. *Brazilian Journal Psychiatry*, v. 171, p. 524 – 9, 1997.
- ALMEIDA, R.N. *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro, RJ, Editora Guanabara Koogans S.A., 2006.
- ANSSEAU, M.; FISCHLER, B.; DIERICK, M.; MIGNON, A.; LEYMAN, S. Prevalence and Impact of Generalized Anxiety Disorder and Major Depression in Primary Care in Belgium and Luxemburg: the GADIS Study. *European Psychiatry*, v. 20, p. 229 – 235, 2005.
- ANDREATINI, R. & BACELLAR, L.F.S. The Relationship Between Anxiety and Depression in Animal Models: A Study Using the Forced Swimming Test and Elevated Plus-Maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 1121 – 1126, 1999.

- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D.
Tratamento Farmacológico do Transtorno de Ansiedade Generalizada:
Perspectivas Futuras. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 23, n. 4, p. 233 – 242, 2001.
- BOISSIER, J.R. & SIMON, P. La Reaction D'exploration Chez la Souris.
Therapie, v. 17, p. 1225 – 1232, 1962.
- BOURIN, M. & HASCOËT, M. The Mouse Light/Dark Box Test. *European
Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 55 – 65, 2003.
- CARLINI, E. A. Plants and the Central Nervous System. *Pharmacology
Biochemistry and Behavior*, v. 75, n. 3, p. 501 – 512, 2003.
- CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A Detailed
Ethological Analysis of the Mouse Open Field Test: Effects of Diazepam,
Chlordiazepoxide and an Extremely Low Frequency Pulsed Magnetic Field.
Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 25, p. 235 – 260, 2001.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic Specificity of a Simple Model for the
Behavioural Actions of Benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and
Behavior*, v. 15, p. 696 – 699, 1981.
- CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C. & VASSOUT, A. The Tail Suspension Test
as a Model for Assessing Antidepressant Activity: Review of
Pharmacological and Genetic Studies in Mice. *Neuroscience and
Biobehavioral Reviews*, v. 29, p. 571 – 625, 2005.

- CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J. & LUCKI, I. Assessing Antidepressant Activity in Rodents: Recent Developments and Future Needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 5, p. 238 – 245, 2002.
- CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J. & LUCKI, I. Assessing Substrates Underlying the Behavioral Effects of Antidepressants Using the Modified Rat Forced Swimming Test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* v. 29, p 547 – 569, 2005.
- DEUSSING, J.M. Animal Models of Depression. *Drug Discovery Today: Disease Models /Disorders of the central nervous system*, v. 3, n. 4, p. 375 – 383, 2006.
- ERNST, E. Herbal Remedies for Depression and Anxiety. *Advances in Psychiatric Treatment*, v. 13, p. 312 – 316, 2007.
- FABRICANT, D.S. & FARNSWORTH, N.R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 1, p. 69 – 75, 2001.
- FERRÉ, P.; FERNÁNDEZ, T. A.; GARCIA E.; ZAPATA, A.; TOBEÑA, A. Struggling and Flumazenil Effects in the Swimming test are Related to the Level of Anxiety in Mice. *Neuropsychobiology*, v. 29, p. 23 – 27, 1994.
- FILE, S.E. Factors Controlling Measures of Anxiety and Responses to Novelty in the Mouse. *Behavioural Brain Research*, v. 125, n. 1 – 2. p. 151 – 157, 2001.

- GORMAN, J.M. Comorbid Depression and Anxiety Spectrum Disorders. *Depression and Anxiety*, v. 4, p. 160 – 168, 1997.
- GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.
- GOODWIN, R.D. & GORMAN, J.M. Psychopharmacologic Treatment of Generalized Anxiety Disorder and the Risk of Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, v. 159, p. 1935 – 1937, 2002.
- GRAY, J.A. Emotional behaviour and the limbic system. *Adv. Psychosom. Med.*, v. 13, p. 1 – 25, 1985.
- GUIMARÃES, F.C. Modelos Experimentais de Doenças Mentais. *Revista ABP – APAL*, v. 15, n. 4, p. 149 – 152, 1993.
- HILAKIVI, L.A. & LISTER, R.G. Correlations Between Behavior of Mice in Porsolt's Swim Test and in Tests of Anxiety, Locomotion, and Exploration. *Behavioral and Neural Biology*, v. 53, p. 153 – 159, 1990.
- KIRKPATRICK, B.; KIM, J.W. & INSEL, T.R. Limbic System Fos Expression Associated with Paternal Behavior. *Brain Research*, v. 658, p. 112 – 118, 1994.
- LEE, S.; FUNG S.C.; TSANG, A.; LIU, Z.R.; HUANG, Y.Q.; HE, Y.L.; ZHANG, M.Y.; SHEN, Y.C.; NOCK, M.K.; KESSLER, R.C. Lifetime

- Prevalence of Suicide Ideation, Plan, and Attempt in Metropolitan China. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 116, p. 429 – 437, 2007.
- LISTER, R.G. Ethologically-Based Animal Models of Anxiety Disorders. *Pharmac. Ther.*, v. 46, n. 3, p. 321 – 340, 1990.
- LISTER, R.G. The Use of a Plus-Maze to Measure Anxiety in the Mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, p. 180 – 185, 1987.
- LOPEZ-DURAN, N.L.; KOVACS, M. & GEORGE, C.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal Axis Dysregulation in Depressed Children and Adolescents: A Meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, v. 34, p. 1272 – 1283, 2009.
- MAES, M.; MELTZER, H.Y.; D'HONDT, P.; COSYNS, P.; BLOCKX, P. Effects of Serotonin Precursors on the Negative Feedback Effects of Glucocorticoids on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Depression. *Psychoneuroendocrinology*, v. 20, n. 2. p. 149 – 167, 1995.
- McWILLIAMS, L.A.; GOODWIN, R.D. & COX, B.J. Depression and Anxiety Associated with Three Pain Conditions: Results From a Nationally Representative Sample. *Pain*, v. 111, p. 77 – 83, 2004.
- MICHELSSEN, K.A.; SCHMITZ, C. & STEINBUSCH, H.W.M. The Dorsal Raphe Nucleus – From Silver Stainings to a Role in Depression. *Brain Research Reviews*, v. 55, p. 329 – 342, 2007.

- MICHELSEN, K.A.; PRICKAERTS, J. & STEINBUSCH, H.W.M. The Dorsal Raphe Nucleus and Serotonin: Implications for Neuroplasticity Linked to Major Depression and Alzheimer's Disease. *Progress in Brain Research*, v. 172, p. 233 – 264, 2008.
- OTTONI, E.B. EthoLog 2.2 - A Tool for the Transcription and Timing of Behavior Observation Sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, v. 32, n. 3, p. 446 – 449, 2000.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of Open:closed Arm Entries in an Elevated Plus-maze as a Measure of Anxiety in the Rat. *J. Neurosci. Methods*, v. 14, p. 149 – 167, 1985.
- PELLOW, S. & FILE, S.E. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-maze: A Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 24, n. 3, p. 525 – 529, 1986.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and Medicinal Plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 237 – 243, 2001.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A. & JALFRE, M. Behavioural Despair in Mice: a Primary Screening Test for Antidepressants. *Archives of International Pharmacodynamics*, v. 229, p. 327 – 336, 1977.
- PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral Despair in Rats: a New Model Sensitive to Antidepressant Treatments. *European Journal of Pharmacology*, v. 47, p. 379 – 381, 1978.

- RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G.C.; WEHRMEISTER, T.D.; IZÍDIO, G.S. Integrating the Open Field, Elevated Plus Maze and Light/Dark Box to Assess Different Types of Emotional Behaviors in One Single Trial. *Behavioural Brain Research*, v. 193, p. 277 – 288, 2008.
- 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.
- RODGERS, R.J & COLE, J.C. Influence of Social Isolation, Gender, Strain and Prior Novelty on Plus-Maze Behaviour in Mice. *Physiololy and Behavior.*, v. 54, n. 4, p. 729 – 736, 1993.
- SHARMA, B.R.; GUPTA, M.; SHARMA, A.K.; SHARMA, S.; GUPTA, N.; NELHAN, N.; SINGH, H. Suicides in Northern India: Comparison of Trends and Review of Literature. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 14, p. 318 – 326, 2007.
- SHER, L.; OQUENDO, M.A. & MANN, J.J. Risk of Suicide in Mood Disorders. *Clinical Neuroscience Research*, v. 1, p. 337 – 344, 2001.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The Tail Suspension Test: a New Method for Screening Antidepressants in Mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367 – 370, 1985.

- STONE, E.A.; LIN, Y. & QUARTERMAIN, D. A Final Common Pathway for Depression? Progress Toward a General Conceptual Framework. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 32, p. 508 – 524, 2008.
- VAN GAALEN, M.M. & STECKLER, T. Behavioural Analysis of Four Mouse Strains in an Anxiety Test Battery. *Behavioural Brain Research*, v. 115, p. 95 – 106, 2000.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A.; The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin*, v. 83, p. 482 – 504, 1976.
- WETZLER S. & KATZ, M.M. Problems with the Differentiation of Anxiety and Depression. *J Psychiatr Res*, v. 23, p. 1 – 12, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The Global Burden Of Disease: 2004 Update. A Response to the Need for Comprehensive, Consistent and Comparable Information on Diseases and Injuries at Global and Regional Level*. 2004. (http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf, acessado em 19/03/2010).
- ZHU, M.-Y; KLIMEK, V.; DILLEY, G.E.; HAYCOCK, J.W.; STOCKMEIER, C.; OVERHOLSER, J.C.; MELTZER, H.Y.; ORDWAY, G.A. Elevated Levels of Tyrosine Hydroxylase in the Locus Coeruleus in Major Depression. *Biol Psychiatry*, v. 46, p. 1275 – 1286, 1999.