

66484
1383194/04
070818

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

O PAPEL DA ACUPUNTURA NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO: IMPLICAÇÕES COM A PARTICIPAÇÃO DE
MECANISMOS OPIÓIDES, GABAÉRGICOS E
SEROTONINÉRGICOS.

EDUARDO FERREIRA COLE

Tese
615.892
C.655-1p
2003

FORTALEZA – CE

2003

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFC

Cole, Eduardo Ferreira
O papel da acupuntura nos níveis de
ansiedade de camundongos submetidos ao
labirinto em cruz elevado: implicações com
a participação de mecanismos opióides,
GABAérgicos e serotoninérgicos /

Eduardo Ferreira Cole. – Fortaleza : O Autor, 2003.

391p. : i1

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do
Ceará. Faculdade de Medicina, 2003.

Inclui bibliografia e anexo

CDD -

CDU -

1. ANSIEDADE – LABIRINTO ELEVADO EM CRUZ – CAMUNDONGOS
2. ACUPUNTURA – DIAZEPAM
3. ANSIEDADE
4. LABIRINTO ELEVADO EM CRUZ
5. CAMUNDONGOS
6. ACUPUNTURA

I. Título

EDUARDO FERREIRA COLE

**O PAPEL DA ACUPUNTURA NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO: IMPLICAÇÕES COM A PARTICIPAÇÃO DE
MECANISMOS OPIÓIDES, GABAÉRGICOS E
SEROTONINÉRGICOS.**

Tese apresentada à Coordenadoria de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, no Curso de Doutorado em Farmacologia, área de concentração: Neurofarmacologia Comportamental, como requisito obrigatório, visando a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. KRISHNAMURTI MORAIS CARVALHO

CO-ORIENTADORA:

Prof.^a. Dr.^a. GISELA COSTA CAMARÃO

FORTALEZA – CE

2003

O PAPEL DA ACUPUNTURA NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO: IMPLICAÇÕES COM A PARTICIPAÇÃO DE
MECANISMOS OPIÓIDES, GABAÉRGICOS E
SEROTONINÉRGICOS.

EDUARDO FERREIRA COLE

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 12 de maio de 2.003:

Prof. Dr. Krishnamurti Morais Carvalho, Ms, PhD. (Orientador)

Prof. Dr. Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello, Ms, PhD.

Prof. Dr. Tetsuo Inada, Dr.

Prof. Dr. Carlos Mauricio de Castro Costa, Ms, PhD.

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale, Dr.

FORTALEZA – CE

2003

DEDICATÓRIA

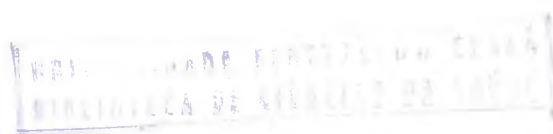
À minha família amada,
Ana Carmen,
Leonardo,
Bruno e
Lucas

Que souberam, como ninguém, me compreender, incentivando e auxiliando a trilhar este árduo caminho da busca incessante da felicidade, meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador,
Krishnamurti Morais Carvalho

Que transcendeu a orientação acadêmica, com sua coragem e audácia, enfrentado o preconceito da Academia, sobretudo pela aceitação do meu trabalho sem reservas e sempre confiante, ensinando-me o valor de um pesquisador, meu reconhecimento é a contínua construção de nossa amizade.



A todos os amigos que de maneira solícita e amistosa souberam compreender meus anseios e me apoiaram nos momentos mais difíceis destes últimos anos, gostaria de salientar o quanto foram fundamentais na elaboração desse estudo, especialmente:

A minha co-orientadora, Gisela Costa Camarão por ter acreditado no meu trabalho e pela dedicada colaboração;

Ao Prof. Dr. Antonio Pedro de Mello Cruz, do Instituto de Psicologia da UnB, pelos seus prestimosos conselhos e orientação.

Mais uma vez, a inestimável assistência fraternal de Gabriel Rivas de Melo (Prof. Dr. Em Estatística e Pró-Reitor de Planejamento) e do Prof. Dr. Eufrazio de Souza Santos (Coordenador da Pós-Graduação de Bioestatística da UFRPE) no encaminhamento e delineamento estatístico desta Tese;

Aos meus estimados amigos e colaboradores Armando José Ribeiro Samico e George Chaves Jimenez, que me acompanham desde a muito tempo;

A Otoni Cardoso do Vale pelo estímulo, compreensão e inoxidável ajuda pessoal;

Ao meu mestre Tetsuo Inada pelos ensinamentos sobre acupuntura e sugestões acerca desse tema;

A todos os colegas e funcionários, vinculados de alguma forma, ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia e a Pós-Graduação em Farmacologia, pela presteza e colaboração e principalmente pela valiosa demonstração de amizade;

A Coordenadoria de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela oportunidade cedida à realização do curso;

Ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela concessão do afastamento;

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Coordenadoria de Assuntos Internacionais e Programas Especiais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e, especialmente ao Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica (PICDT)/CAPES, pela bolsa de estudos facultada.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Natureza da ansiedade.....	17
2.2. Edificação de um modelo animal de ansiedade para validação comportamental e farmacológica.....	19
2.3. O labirinto elevado em forma de cruz (LEC).....	26
2.4. Perfil comportamental, especialmente de camundongos no LEC.....	31
2.5. Ansiedade e suas interações com o sistema GABAérgico.....	55
2.6. Ansiedade e suas interações com o sistema opióide.....	98
2.7. Ansiedade e suas interações com o sistema serotoninérgico.....	138
2.8. Acupuntura na ansiedade.....	177
3. OBJETIVO.....	188
3.1. Objetivo geral.....	188
3.2. Objetivos específicos.....	188
4. HIPÓTESE.....	189
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	190
5.1. Local do experimento.....	190
5.2. Animais.....	193
5.3. Delineamento experimental.....	194
5.3.1. Modelo experimental; Divisão e agrupamento e Análise estatística.....	194
5.3.2. Tratamentos.....	198
6. RESULTADOS.....	203
7. DISCUSSÃO.....	303
8. CONCLUSÕES.....	327
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	329
ABSTRACT.....	373
ANEXOS.....	375

SUMÁRIO DE ANEXOS

	Páginas
1. ANEXOS.....	375
2. TABELAS.....	376
2.1. Tabela 1. Randomização e alocação dos animais.....	377
3. FIGURAS.....	378
3.1. Figura 1. Esquema dos acupontos utilizados.....	379

ABREVIATURAS USADAS NESTE TRABALHO

<p>% n^o</p> <p>5-HT₁₋₇</p> <p>5-HT_{1/A-D}</p> <p>5-HT_{2A/C}</p> <p>5-HT_{5/A-B}</p> <p>5-HTP</p> <p>α-Me5-HT</p> <p>AOAA</p> <p>B₁₋₉</p> <p>Balb/C</p> <p>BDZ</p> <p>Beta-CCM</p> <p>BHE</p> <p>BZ₁</p> <p>BZ₂</p> <p>C57/BL</p>	<p>= o número de entradas nos braços abertos, expresso como uma percentagem ou a proporção do total de ingressos nestas vias, relativamente ao total de visitas nas passarelas, sejam elas abertas ou fechadas.</p> <p>= subtipos de receptor serotoninérgico</p> <p>= subtipos de receptor serotoninérgico</p> <p>= subtipos de receptor serotoninérgico</p> <p>= subtipos de receptor serotoninérgico</p> <p>= 5-hidroxitriptofano</p> <p>= α-metil-5-hidroxitriptamina</p> <p>= Inibidor de GABA-T</p> <p>= núcleos da rafe</p> <p>= linhagem de camundongo</p> <p>= benzodiazepínicos</p> <p>= agonista inverso BDZ</p> <p>= barreira hemato-encefálica</p> <p>= subtipo de receptor BDZ</p> <p>= subtipo de receptor BDZ</p> <p>= linhagem de camundongos</p>	<p>% t</p> <p>≥</p> <p><</p> <p>°C</p> <p>90^o</p> <p>5-CAT</p> <p>5-HT</p> <p>β-CCE</p> <p>μmol/g</p> <p>a.m.</p> <p>Ach</p> <p>AGD</p> <p>AMPc</p> <p>i.e.</p> <p>i.p.</p> <p>ICI-118,551</p>	<p>= o tempo despendido sobre as ruelas abertas, expresso como uma percentagem ou proporção do tempo total sobre estes ramos, relativamente ao tempo total despendido nos braços abertos e fechados</p> <p>= maior ou igual</p> <p>= menor e/ou menos</p> <p>= graus centígrados</p> <p>= noventa graus</p> <p>= 5-carboxamidotriptamina</p> <p>= 5-hidroxitriptamina</p> <p>= etil β-carbolina 3-carboxilato</p> <p>= micromolar por gramo</p> <p>= período da manhã</p> <p>= acetilcolina</p> <p>= ácido glutâmico</p> <p>= descarboxilase 3'-5' monofosfato de adenosina</p> <p>= isto é</p> <p>= intraperitoneal</p> <p>= antagonista β₂</p>
---	--	--	---

C7	= ponto 7 do meridiano do coração	Im	= imobilidade completa
CA₁	= neurônios piramidais hipocampais	InsP₃	= inositol(1,4,5)-trifosfato
Ca²⁺	= cálcio	IPSPs	= potenciais pós-sinápticos tardios
CA₃	= neurônios piramidais hipocampais	K⁺	= potássio
CCK	= colecistoquinina	KD	= kilodalton
CCK-4	= agente panicogênico	KOJIC	= 2-aminometil-3-hidroxi-4H-piran-4-ona
CCK-8	= agente panicogênico	L-365260	= antagonista CCK _B
CCK_B	= subtipo de receptor de CCK	L-5-HTP	= Levo-5-hidroxitriptofano
CD1	= linhagem de camundongo	LD	= "Light-Dark"
CGP35348	= antagonista GABA _B	L-DOPA	= levo-diidroxifenilalanina (LEVO-DOPA)
CGP54626	= antagonista GABA _B	LSD	= dietilamida do ácido lisérgico
CL⁻	= cloro	MAO	= monoamina-oxidase
cm	= centímetros	mCPP	= agonista 5-HT _{2C}
d	= diâmetro	MDL-100,907	= antagonista seletivo 5-HT _{2A}
D₁₋₃	= subtipos de receptor dopaminérgico	MDMA	= 3,4-metilenodioximetanfetamina ("ectasy")
DA	= dopamina	mg/kg	= miligramas por quilograma
DBA/2	= linhagem de camundongos	mm/min.	= milímetros por minuto
DBI	= peptídeo endógeno inibidor de ligação do diazepam	n	= tamanho da amostra
Dip	= "head-dipping"	NA	= noradrenalina
DOB	= 2,5-dimetoxi-4-bromoamfetamina	NAD⁺	= nicotinamida denucleotídeo fosfato
DOI	= 2,5-dimetoxi-4-odoanfetamina	NADH	= NAD reduzido
Doub	= "doubling back"	NAN-190	= antagonista 5-HT _{1A} /α ₁
DPAG	= área cinzenta periaquedutal dorsal	NIH	= linhagem de camundongo
DSM-IV	= "diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4 th ed".	nmol/g	= nanomolar por gramo
		NMRI	= linhagem de camundongos
		Nº	= número

e.g.	= em geral	No-711	= bloqueador de recaptção do GABA
ED ₅₀	= dose necessria para a produo de uma resposta em 50% do n	NPY	= neuropeptdio Y
et al.	= colaboradores	OH	= radical hidroxila
FG 7142	= agonista inverso BDZ	p.m.	= perodo da tarde e da noite
g	= gramos	p.o.	= por via oral
GABA	= cido gama-aminobutrico	PCPA	= p-clorofenilalanina
GABA _{A/B}	= subtipos de receptor GABA	PD135158	= antagonista CCK _B
GABA-T	= GABA-transaminase		
GR	= antagonista seletivo 5-HT _{1D}		
127935			
GTP	= guanossina-5'-trifosfato	PKC	= proteina quinase C
h	= hora	PLP	= piridoxal fosfato
H ₁	= subtipo de receptor histaminergico	pMPPI	= antagonista 5-HT _{1A}
PTZ	= antagonista GABA _A	SSRI	= inibidores seletivos de recaptção de serotonina
REM	= "rapid eye movement"	T1	= linhagem de camundongo
RNA _m	= cido desoxiribonucleico mensageiro	TFMPP	= agonista 5-HT _{1B}
RO 15-1799	= flumazenil	THIP	= um anlogo biclclico do muscimol
RO 15-4513	= agonista parcial BDZ	TL	= latncia de transferncia
		u	= Desprotegido ("unprotected")
s.c.	= subcutnea	U.K.	= United Kingdom
SASD	= semi-aldeido succnico desidrogenase	VIP	= polipetdio intestinal vasoativo
SC-53116	= agonista seletivo 5-HT ₄	vs	= versus
SCH23390	= antagonista D ₁	VSVs	= vocalizaes ultrasnicas
SDZ-205557	= antagonista seletivo 5-HT ₄	W	= Watt
SDZ 216525	= antagonista 5-HT _{1A}	WAY 100135	= antagonista 5-HT _{1A}
seg	= segundos	WAY 100289	= antagonista 5-HT ₃
SKF38393	= agonista D ₁	WAY 100635	= antagonista 5-HT _{1A}

O PAPEL DA ACUPUNTURA NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: IMPLICAÇÕES COM A PARTICIPAÇÃO DE MECANISMOS OPIÓIDES, GABAÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS.

RESUMO

Este trabalho objetivou estudar o papel da acupuntura nos níveis de ansiedade de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LEC) e suas implicações com a participação de mecanismos opióides, gabaérgicos e serotoninérgicos. Utilizou-se 170 animais, todos machos, com 12-15 semanas, alojados conjuntamente e sob condições de ciclo de luz revertido à cada 12 horas (acionada às 19 h.), por cinco semanas previas ao teste LEC, que foi realizado das 10-14 h., sendo totalmente (5 min.) gravado em vídeo para posterior análise, por indivíduo treinado que não o investigador. Os camundongos foram separados aleatoriamente em 13 grupos, que sujeitaram-se a aplicação do LEC 45 min. Após os tratamentos terem sido efetuados. O comportamento dos animais foi avaliado conforme os parâmetros tradicionais (Lister, 1987) de % n0 e % t, subjulgados à uma análise de variância. Os grupos acupuntura e diazepam acusaram diferenças estatisticamente significantes do grupo controle/salina, embora, entre si, tenham tido uma postura comparativa não significativa, o que conduz a conclusão de que ambos grupos possuem efeito ansiolítico da mesma magnitude. Também verificou-se o envolvimento do sistema opióide no mecanismo de ação da acupuntura, visto que a naloxona reverteu totalmente os efeitos ansiolíticos da mesma.

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade humana, por representar um fenômeno multifacetado (Beck et al., 1985; Lister, 1985; Marks, 1987; Clark, 1989; Beuzen et al., 1995; Rang et al., 1997), compartilha em diversas circunstâncias e em inúmeros aspectos específicos, do envolvimento de mais de um sistema de mediadores, sugerindo uma atuação sinérgica no sistema nervoso central. Dentre esses neurotransmissores, incluem-se especialmente três que desempenham papéis relevantes, seja na sua etiologia, sintomatologia e/ou terapêutica, que tem sido mais estudados e associados a este distúrbio afetivo, que são os sistemas GABAérgico, HTérgico e opióide. Em se tratando de organismos vivos, tanto os seres humanos como os animais, possuem sofisticados e intrincados processos fisiológicos, muitas vezes desconhecidos, que interagem entre si, na produção de respostas adequadas (ou não), diante de várias situações relacionadas a complexa neurobiologia das alterações relacionadas à defesa/medo e/ou emoções/afetividade.

A acupuntura já tem sido utilizada na clínica médica neurológica, de maneira eficiente, no tratamento de distúrbios tais como, síndromes vestibulares centrais e periféricas, síndromes cerebelares e da medula espinhal tóraco-lombar e lombo-sacra (Cole, 1996).

É possível a verificação de efeitos positivos, decorrentes da aplicação da acupuntura, em pacientes portadores de alterações comportamentais como as síndromes de ansiedade (Cole, *observações pessoais*, 1996).

As condições clínicas relacionadas com a ansiedade incluem ansiedade fóbica e distúrbios do pânico e, é difícil estabelecer uma distinção entre os estados “patológico” e “normal” de ansiedade, porém e apesar dessa imprecisão diagnóstica (ou talvez por causa dela), os fármacos ansiolíticos estão entre as substâncias prescritas com maior frequência.

Um estudo realizado em países da Europa Ocidental na metade dos anos 80 mostrou que a proporção da população total que utiliza agentes ansiolíticos regularmente era de 17% na Bélgica e na França, de 14% no Reino Unido e de 10% na Espanha (Rang et al., 1997).

Sabe-se que o sistema GABAérgico está intimamente envolvido no efeito tranqüilizante dos benzodizepínicos, substâncias ansiolíticas mais utilizadas atualmente em terapêutica. Os benzodizepínicos agem no mesmo complexo protéico receptor do GABA, em um diferente sítio, aumentando a sua afinidade pelo GABA endógeno. Assim, a frequência da abertura do canal de cloro é aumentada, havendo um maior influxo desse íon para dentro do neurônio, resultando em hiperpolarização, o que origina uma inibição da excitabilidade de certas áreas do sistema límbico, e conseqüentemente o efeito ansiolítico (Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997).

Por outro lado, reconhece-se também, que os peptídeos opióides endógenos como a β -endorfina, a metencefalina, a leu-encefalina e a dinorfina, produzem analgesia quando injetadas localmente no encéfalo, e que suas ações celulares são basicamente inibitórias. No encéfalo, a β -endorfina é encontrada principalmente em neurônios que se projetam do hipotálamo para o tálamo e tronco encefálico, enquanto as encefalinas são detectadas principalmente em interneurônios curtos em muitas regiões do encéfalo. As ações dos peptídeos opióides, como as dos opiáceos sintéticos, são mediadas por três tipos distintos de receptor (μ , δ e κ) (Rang et al., 1997). As respostas farmacológicas associadas a esses três tipos de receptor e o comprometimento dos peptídeos opióides na analgesia e na dor têm, portanto, influência no comportamento relacionado à alguns aspectos da ansiedade.

De todos os neurotransmissores conhecidos, a serotonina (5-HT) permanece historicamente como aquele mais intimamente envolvido com a neuropsicofarmacologia, e atualmente, as alterações na função da 5-HT tem sido implicadas nas desordens afetivas, nos distúrbios obsessivos/compulsivos, na esquizofrenia, nos diferentes estados de ansiedade, nas alterações fóbicas, nas desordens associadas à ingestão, na enxaqueca e nos distúrbios do sono (Cooper et al., 1996).

A acupuntura, uma das mais antigas formas de tratamento clínico, que no Oriente vem sendo usada como modalidade preventiva e terapêutica por vários milênios (Wei-Kang, 1975; Mann, 1982; Wen, 1985; Auteroche et al., 1986; Bastos, 1993; Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996), poderá estabelecer, desta forma, uma expectativa terapêutica na conduta clínica da ansiedade. Assim, esta pesquisa tem como finalidade a avaliação dos efeitos obtidos através da utilização da acupuntura sobre os níveis de ansiedade de camundongos submetidos ao modelo de ansiedade labirinto elevado, bem como procurar estabelecer qual o principal sistema de mediadores envolvido no seu emprego.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NATUREZA DA ANSIEDADE.

As principais manifestações da ansiedade (Dews, 1981) são: *Queixa verbal*, os pacientes dizem que estão excessivamente ansiosos; *Efeitos somáticos e autônomos*, o paciente apresenta-se inquieto e agitado, exibindo taquicardia, aumento da transpiração, chora em demasia e, com bastante frequência, sofre de distúrbios gastrointestinais e, finalmente, *Interferência com as atividades produtivas normais*. As condições clínicas relacionadas com a ansiedade incluem, dentre a multiplicidade de suas facetas (Lister, 1985; Beuzen et al., 1995), as vezes de caráter pessoal (Beuzen et al., 1995), a ansiedade fóbica e os distúrbios do pânico (Rang et al., 1997). Nos estados fóbicos, a ansiedade é desencadeada por circunstâncias específicas, tais como espaços abertos, interações sociais ou medo de animais, sobretudo os peçonhentos. No distúrbio do pânico, ocorrem episódios de medo insuportável em associação com acentuados sintomas somáticos, tais como transpiração, taquicardia, dores torácicas, tremores, asfixia, sensação de lipotímia, de morte iminente e mais uma enormidade extraordinária de sinais clínicos particulares e exclusivos (Beck et al., 1985; Lister, 1985; Marks, 1987; Clark, 1989; Beuzen et al., 1995; Rang et al., 1997).

Desde a virada do século, psiquiatras têm debatido se a ansiedade e a depressão constituem diferentes aspectos da mesma desordem ou se são distúrbios distintos, com superposição de condições (Hoehn-Saric et al., 1994). Discussões contemporâneas sobre este assunto enfatizam, não somente o alto grau de sintomas coincidentes destas desordens (Nutt et al., 1989), mas também a ausência de uma clara demarcação terapêutica entre elas (Nutt, 1991; Tyrer et al., 1994).

Diversos argumentos conduzem à suposição de que os processos, relacionados à ansiedade e a memória formam duas entidades estreitamente associadas (Beuzen et al., 1995). Esta evidência emerge, tanto das teorias sobre as funções cerebrais (Gray, 1982; Barlow, 1991), como dos estudos anatômicos e farmacológicos (Beuzen et al., 1995).

Além disso, o assunto é pleno de complexidades, porque nem a ansiedade nem a memória representam um fenômeno unitário (Beuzen et al., 1995). Por exemplo, em seres humanos, dois principais tipos de ansiedade têm sido definidos: “uma faceta da ansiedade” e “um estado de ansiedade”. “Estado de ansiedade” é conceituado por Lister (1985), como a ansiedade que um indivíduo experimenta, em um momento particular do tempo, que pode ser aumentada pela presença de um estímulo ansiogênico (Beuzen et al., 1995).

Contrariamente, “uma faceta da ansiedade”, não varia de momento à momento e, é considerada como sendo “um duradouro aspecto da ansiedade pessoal” (Beuzen et al., 1995).

A ansiedade é um fenômeno humano subjetivo e, exceto para algumas das alterações somáticas e autônomas associadas, não possui um equivalente *óbvio* nos animais experimentais (Rang et al., 1997). Embora reconhecendo seus aspectos ocultos ou subjetivos, a ansiedade humana é invariavelmente refletida nas evidentes perturbações comportamentais incluindo, por exemplo, o ato de esquivar-se (Griebel et al., 1995; Griebel et al., 1996b), de fuga (Griebel et al., 1995; Griebel et al., 1996b), vocalização não verbal (Millan et al., 1997), e/ou hipervigilância (Beck et al., 1985; Marks, 1987; Eysenck, 1991). Quando também observada nos animais, tais respostas sugerem um estado afetivo comum (Rodgers et al., 1997a).

2.2. EDIFICAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE ANSIEDADE PARA VALIDAÇÃO COMPORTAMENTAL E FARMACOLÓGICA.

De acordo com as observações expostas acima, alguns autores (Rodgers et al., 1997a), enfatizam que, no mínimo, pode-se dizer que as respostas humanas e animais são *análogas*, e desse modo é necessário prover estas novas facetas da ansiedade (Lister, 1985; Beuzen et al., 1995), na validação para o modelo animal.

Construir validação (Rodgers et al., 1997a), por outro lado, implica que as respostas humanas e animais sejam *homólogas* (tenham um substrato comum) e, além disso, que a resposta em questão tenha significado clínico para a desordem à ser modelada (Willner, 1991). Nisto reside um problema significativo (Rodgers et al., 1997a), - na ausência de uma compreensão detalhada do substrato da ansiedade humana, torna-se impossível estabelecer rigorosamente, uma homologia entre os padrões de resposta animal e humana.

Não obstante, o verdadeiramente extraordinário paralelo, existente entre as reações de medo/ansiedade em seres humanos e animais, sugere que pelo menos alguns padrões de resposta animal podem, afinal das contas, satisfazer o critério de homologia (Rodgers et al., 1997a).

Recentemente, vários relatos clínicos têm conceituado as alterações humanas relativas à ansiedade, como distúrbios de defesa (Beck, 1976; Blanchard et al., 1984; Blanchard et al., 1988; Clark, 1989; Kidman, 1989; Deakin et al., 1991; Griebel et al., 1995; Griebel et al., 1996b; Fernandez, 1997) que, possuem como característica principal, a inadequada ativação do comportamento defensivo, que surge da errônea avaliação do perigo (Rodgers et al., 1997a). Alguns modelos teóricos, como o de Gray (1982), sugerem que a ansiedade aparece, quando as informações percebidas pelo animal e àquelas já armazenadas na memória, são mal administradas, incluindo desta maneira, mais um fator determinante no processo de ansiedade (Beuzen et al., 1995).

Assim, uma compreensão da neurobiologia do comportamento defensivo e/ou memória, assume particular importância na pesquisa relacionada à ansiedade (Rodgers et al., 1997a) e, neste contexto, recentes estudos têm apontado para a notável similaridade, entre vertebrados acerca do sistema nervoso [por exemplo, amígdala, periaqueduto na substância cinzenta (PAG)], envolvido na identificação do perigo e na produção de respostas de defesa (Depaulis et al., 1991; Davis, 1992; Brandão, 1993; Motta et al., 1993; Motta et al., 1995). Além disso, algumas estruturas cerebrais, como o hipocampo (Olton et al., 1979; Huttunen et al., 1986; Kostowski et al., 1989) ou a amígdala (Nagy et al., 1973; Izquierdo et al., 1991; LeDoux, 1992) estão implicadas, tanto com a memória como com a ansiedade, sendo conhecido que compostos que reduzem a ansiedade também prejudicam a memória (Beuzen et al., 1995). Por exemplo, os benzodiazepínicos têm, não somente propriedades ansiolíticas, mas também amnésicas, no homem (Lister, 1985) e nos animais (Thiebot, 1985). Ademais, outros compostos ansiolíticos, como os agonistas do receptor 5-HT_{1A} (Barnes et al., 1991), prejudicam a memória nos animais (Rowan et al., 1990; McEntee et al., 1991; Lee et al., 1992; Quartermain et al., 1993). Também atrai à atenção, o fato deste sistema ter sido conservado, assim tão fortemente, durante a evolução (Rodgers et al., 1997a), de maneira que pode-se aprender muito, sobre a defesa humana ou a respeito das reações de medo, estudando-se outras criaturas (LeDoux, 1995).

A mais de duas décadas, já se sustentava a idéia de que os animais são capazes de exibir diversas reações defensivas, em resposta à ameaças externas, como por exemplo, a presença de um predador ou de um exemplar de espécie co-específica mais agressivo (Edmunds, 1974).

Como muitos modelos animais de ansiedade são baseados, na exploração de novos (e, conseqüentemente, perigosos em potencial) ambientes, é provável esperar que estas circunstâncias, também conduzam à um comportamento coletivo de “avaliação de risco”, nestes aparatos (Rodgers et al., 1997a).

A formatação dos modelos animais, que representa a maior preocupação no delineamento da pesquisa, na fase pré-clínica, relacionada a neurobiologia das alterações psiquiátricas, produzem paradigmas que são empregados, tanto como ferramentas de “screening”, na busca de novos agentes terapêuticos, como também em simulações realizadas em estudos, sobre mecanismos básicos de ação (Lister, 1990; Green et al., 1991; Handley, 1991; Stephens et al., 1991; File, 1992; Rodgers et al., 1994a; Treit, 1994; Griebel, 1995; Rodgers et al., 1997a). Mais de 30 modelos animais de ansiedade estão atualmente em uso e, enquanto alguns são fundamentados em parâmetros fisiológicos, como ocorre com observações vinculadas à temperatura corporal ou apoiados em variáveis endócrinas, as respostas ao estresse, na vasta maioria das vezes, são comportamentais “*in natura*”, isto é, espontâneas (Rodgers et al., 1997a).

Os modelos comportamentais podem ser convenientemente classificados, como produtores de respostas condicionadas ou não condicionadas, à estímulos capazes de causar ansiedade em seres humanos e, apesar dos modelos condicionantes permitirem razoável precisão em experimentos, com relativo controle dos comportamentos basais, eles muitas vezes, necessitam da privação de alimentos ou de água, da utilização de choque elétrico e, sobretudo de considerável investimento de tempo no treinamento dos indivíduos (Rodgers et al., 1997a).

Diversamente, embora propensos a conter mais variáveis basais, os modelos não condicionadores (os espontâneos) do comportamento, geralmente possuem um alto grau de validade ecológica, e são menos susceptíveis em gerar confusões, que surgem de interferências relacionadas (Miyazaki et al., 1995) ao aprendizado/memória, apetite/sede ou mecanismos nociceptivos e, ao menos em princípio, permitem desenhar um perfil comportamental verdadeiramente pormenorizado nas intervenções experimentais (Rodgers et al., 1997a).

Na tradicional visão da farmacoterapia na abordagem, dos distúrbios relacionados a ansiedade humana, talvez seja compreensível, que a maioria dos “approaches” para a validação de modelos animais de ansiedade, tenha sido farmacológico (Rodgers et al., 1997a).

Assim, enquanto muitos destes procedimentos, têm um grau razoável de validade, sua alegação principal para este estatus, permanece sendo relativa a uma resposta seletiva à agentes, com estabelecida eficácia na prática clínica, do tratamento das desordens da ansiedade [validade preditiva (Rodgers et al., 1997a)].

Como os benzodiazepínicos (BDZ) tem sido predominantes, neste campo, durante aproximadamente quatro décadas, validações farmacológicas têm, na prática, envolvido a utilização do clordiazepóxido ou do diazepam como um “padrão” (Rodgers et al., 1997a). Embora esta abordagem tenha demonstrado de maneira eficiente, a identificação de outros agentes potencialmente ansiolíticos, ligados ao complexo receptor BDZ/GABA_A, uma desvantagem óbvia, consiste na identificação de compostos, que podem alcançar efeitos anti-ansiedade satisfatórios, através de mecanismos não relatados e sem esta conexão (Rodgers et al., 1997a). Um excelente exemplo, das armadilhas em se adotar uma abordagem puramente farmacológica, para realizar validação (Rodgers et al., 1997a), foi a insensibilidade geral dos modelos existentes, para com a buspirona, um agonista parcial do 5-HT_{1A} clinicamente efetivo (Handley, 1991; Rodgers et al., 1994a; Treit, 1994; Griebel, 1995).

Tais problemas conduziram a uma difundida [e, na visão de Rodgers et al. (Rodgers et al., 1997a), não comprovada] análise de que os modelos, por si mesmos, são precisos, em lugar de elaborar uma aceitação mais lógica do fato, de que “somente a validação farmacológica não é adequada para se testar como modelo de ansiedade” (Lister, 1990 p. 323), sendo que aqueles procedimentos existentes deveriam ser considerados mais corretamente como “modelos benzodiazepínicos da psicofarmacologia” (Green et al. 1991, p. 22).

A necessidade de uma nova estratégia, na fase pré-clínica da pesquisa relacionada a ansiedade, não é somente indicada pela aparente limitação dos modelos animais existentes, mas também pela necessidade de modernizar, de prover tratamentos seguros e efetivos para a integral série de desordens relativas à ansiedade (Lister, 1985; Beuzen et al., 1995; Rodgers et al., 1997a).

Neste contexto, já existe uma preocupação médica e pública sobre os efeitos colaterais dos ansiolíticos comumente prescritos, como os benzodiazepínicos, os quais agudamente podem incluir deterioração cognitiva e, cronicamente, o desenvolvimento de dependência (Rodgers et al., 1997a), mesmo na dose normal (Lader, 1991). Além destes problemas, que podem ou não ser manejáveis (Ashton, 1994), está amplamente estabelecido que os benzodiazepínicos, são só verdadeiramente efetivos no tratamento, de uma das muitas condições relacionadas à ansiedade, reconhecidas pelo DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994), i.e., distúrbio de ansiedade generalizado (Rodgers et al., 1997a). Desta forma, há também uma necessidade de se demonstrar, através do desenvolvimento de modelos animais, para os *diferentes* estados de ansiedade (Lister, 1985; Beuzen et al., 1995) e, não somente para aqueles que respondem aos benzodiazepínicos (Rodgers et al., 1997a). Embora possa parecer provável, que os modelos existentes podem, em maior ou menor extensão, validar experimentos farmacológicos e, já que estão surgindo facetas diferentes da ansiedade (Lister, 1985; File, 1992; Beuzen et al., 1995; Fernandez, 1997), não está claro ainda, de que maneira os testes individuais, podem referir-se a uma específica condição clínica (Rodgers et al., 1997a).

Não obstante, considerando a questão mais ampla acerca de melhorar o modelo animal, parece prudente (Rodgers et al., 1997a) ter em mente, que um "...equilíbrio deve ser adotar um, entre a proliferação de novos modelos e o refinamento daqueles já existentes" (Barret, 1991 p. 49).

A utilidade de um modelo animal de ansiedade, repousa não só em sua habilidade, para detectar mudanças bidirecionais na ansiedade, com estabelecida ou suposta ação ansiolítica/ansio gênica, mas também em: i) excluir compostos que são inativos ou não-específicos, em sua ação comportamental, e ii) destacar novos (talvez inesperados) efeitos de uma droga ou de um tratamento, que podem prover percepções recentes, em mecanismos envolvidos na modulação de comportamentos afetivos (Rodgers et al., 1997a).

2.3. O LABIRINTO ELEVADO EM FORMA DE CRUZ (LEC).

O labirinto elevado em cruz é indubitavelmente um dos modelos animais mais amplamente utilizados em pesquisa pré-clínica contemporânea sobre ansiedade (e.g., Pellow et al., 1985; Lister, 1987; File, 1990; File et al., 1990; File et al., 1992; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; File, 1993; File et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Cruz et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al.,

1995a; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; File et al., 1996; Hogg, 1996; Rodgers et al., 1996; Avgustinovich et al., 1997; Griebel et al., 1997; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c).

Este teste deriva da antiga observação de que, em labirintos consistindo de ruelas abertas e fechadas, os ratos vigorosamente mostram elevados níveis de comportamento exploratório, nos caminhos fechados e, quando se defrontam com uma opção de escolha, relativa ao tipo de via, tipicamente evitam àquelas desprovidas de paredes (Montgomery, 1955). Há aproximadamente 30 anos atrás, este achado conduziu ao primeiro estudo, sobre a potencial utilidade de um elevado "X-maze" (Handley et al., 1984), como um modelo de ansiedade (Rodgers et al., 1997a).

Usando a configuração de um labirinto simples, elevado 70 cm sobre o nível do solo, compreendendo dois braços abertos e dois fechados (como vias que se opõem uma à outra), estes autores (Handley et al., 1984), não só confirmaram que os ratos evitam os caminhos abertos, como também demonstraram, que a aversão as ruelas abertas, era reduzida pelo diazepam e agravada com a picrotoxina (um agente ansiogênico) (Rodgers et al., 1997a).

Validações do teste (atualmente denominado labirinto elevado) para utilização com ratos (Pellow et al., 1985) e camundongos (Lister, 1987) rapidamente seguiu este relato inicial, e pesquisas mais recentes tem sugerido sua potencial utilidade para outras espécies (Rodgers et al., 1997a), incluindo porquinhos da índia (Rex et al., 1994), ratos silvestres (Hendrie et al., 1994) e "hamsters" sírios (Yannielli et al., 1996).

Desde o início, os primários índices de ansiedade no “LEC” eram correlacionados à conceitos espaço-temporais “*in natura*” [i.e., o número de entradas nos braços abertos, expresso como uma percentagem ou a proporção do total de ingressos nestas vias, relativamente ao total de visitas nas passarelas, sejam elas abertas ou fechadas (% n^o), e o tempo despendido sobre as ruelas abertas, expresso como uma percentagem ou proporção do tempo total sobre estes ramos, relativamente a duração da sessão (% t) (Pellow et al., 1985; Lister, 1987; Hogg, 1996; Rodgers et al., 1995c)], enquanto o total de entradas nos caminhos, freqüentemente têm (mas erroneamente, veja mais adiante) sido empregado como uma medida geral da atividade locomotora (Rodgers et al., 1997a).

As vantagens do “LEC” convencional são óbvias e numerosas (Rodgers et al., 1997a): validade ecológica (comportamento espontâneo), economia, velocidade, simplicidade e sensibilidade bidirecional, acoplada ao fato, de que os procedimentos não requerem prolongados treinamentos, envolvendo a privação da alimentação e/ou de água e a aplicação de choque elétrico (Pellow et al., 1985; Miyazaki et al., 1995). E, enquanto não há nenhuma dúvida, que o “LEC” convencional é altamente sensível à influência de manipulações, relacionadas ao complexo receptor benzodiazepínico/GABA_A (Rodgers et al., 1997a), efeitos obtidos com outros agentes que modulam a ansiedade (e.g., buspirona), têm gerado uma quantidade muito maior de variáveis (Handley et al., 1993b; Rodgers et al., 1994a; Griebel, 1995).

Embora este perfil tenha conduzido certos autores à duvidar da utilidade/confiabilidade do modelo (Moser, 1989), interpretações alternativas desta inconsistência farmacológica, são da mesma maneira, plausíveis (Rodgers et al., 1997a).

Como já foi notado, o modo pelo qual testes, como o “LEC”, foram originalmente desenvolvidos (i.e., fundamentados em critérios, relativos aos efeitos dos benzodiazepínicos) e, de que fornecem ferramentas excelentes, para a detecção de compostos, associados ao complexo receptor benzodiazepínico/GABA_A, uma crítica relativa à sua insensibilidade, à agentes que operam por mecanismos completamente diferentes, poderia parecer avarenta, para dizer o mínimo (Rodgers et al., 1997a).

Neste (relevante) ponto, afóra os achados negativos e/ou contraditórios que ocorreram com a buspirona e, que podem ter surgido do uso de uma série de doses inapropriadas (e.g., relacionadas aos sítios de ação, pré vs pós-sináptico) ou, realmente, com o fato de que, os estudos com modelos animais, frequentemente / não envolverem a administração aguda e, principalmente considerando-se que a experiência clínica, somente indica eficácia terapêutica, após várias semanas de tratamento (Rodgers et al., 1997a, veja também Treit, 1991), surge uma apreciação igualmente importante, um tanto paradoxal, das vantagens acima mencionadas do modelo “LEC”.

Portanto, o fato de um labirinto ser construído rapidamente, de as sessões serem pequenas [cinco minutos (e.g., Pellow et al., 1985; Lister, 1987; File, 1990; File et al., 1990; File et al., 1992; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; File, 1993; File et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Cruz et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; File et al., 1996; Hogg, 1996; Rodgers et al., 1996; Avgustinovich et al., 1997; Griebel et al., 1997; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c)] e de o registro convencional ser seguro e fácil, ele transformou-se em um instrumento (Rodgers et al., 1997a) e, a adoção do teste, foi realizada através de numerosos laboratórios de pesquisa [pelo menos 100 de acordo com uma recente pesquisa; (Hogg, 1996)].

Infelizmente, da mesma maneira, sustentar uma tradição, de que existem “tantas psicologias, quanto há psicólogos, provavelmente, há tantos modelos “LEC”, quanto existem laboratórios conduzindo pesquisas pré-clínicas sobre ansiedade” (Rodgers et al., 1997a, p. 293). As principais diferenças entre laboratórios portanto, está na utilização do modelo “LEC”, e estas abrangem uma ampla extensão, relacionada à animais e variáveis processuais (Rodgers et al., 1997a), que serão discutidas mais adiante. Desta forma, é essencial que os laboratórios que utilizam, ou planejam utilizar o “LEC”, invistam tempo e esforços suficientes, na definição de condições ótimas, para a aplicação do teste, antecipadamente ao estudo com drogas (Rodgers et al., 1997a), ou com tratamentos alternativos.

2.4. PERFIL COMPORTAMENTAL, ESPECIALMENTE DE CAMUNDONGOS, NO “LEC”.

O resultado, de um recente estudo analítico de fatores, em cima de um amplo coorte de camundongos DBA/2, não tratados com fármacos, identificou uma estrutura de seis fatores contabilizados, que representam mais que 75% da variância total (Rodgers et al., 1995c). Em íntima concordância com a análise fatorial realizada em camundongos (Lister, 1990) e em ratos (File, 1992), os índices primários de ansiedade e atividade locomotora conduziram à fatores separados (Fatores 1 e 2, respectivamente) (Rodgers et al., 1995c).

Por outro lado, entradas nos braços fechados levaram vigorosamente e exclusivamente ao Fator 2, corroborando a superioridade desta mensuração (vs total de entradas, como um índice da atividade locomotora (Rodgers et al., 1997a, veja também, Lister, 1987; File, 1992; Cruz et al., 1994; Fernandes et al., 1996; McCreary et al., 1996).

Em relação a suposição, freqüentemente formulada, de que todas as espécies e/ou linhagens, capitulam às mesmas respostas, nas manipulações farmacológicas, com o “LEC”, existem pesquisadores (Handley et al., 1993a) que relatam que a % n^o, tende a ser mais baixa em ratos albinos, quando comparada com os pigmentados, que podem ser contestadas, por terem sido estruturadas em experimentos, nos quais outras variáveis (e.g., altura das paredes do “LEC” e da sua distância relativa ao solo) não foram mantidas constantes (Hogg, 1996). Ao passo que uma revisão acerca dos efeitos dos ligantes de 5-HT, em modelos animais de ansiedade, relata que após a administração de buspirona isoladamente, não houve qualquer sugestão sobre diferenças, na sensibilidade de ratos Wistar albinos e pigmentados (Griebel, 1995).

Enquanto, um artigo de revisão (Hogg, 1996) comenta que, embora não seja possível analisar o comportamento de camundongos, relativo as ações de muitos compostos, já que o número de trabalhos é muito pequeno e, de que a despeito disso, existe alguma evidência de que a sensibilidade farmacológica dos efeitos ansiolíticos, ligados aos antagonistas do receptor 5-HT₃ e aos agonistas do receptor 5-HT_{1A}, são linhagem-dependentes, outros autores (Rodgers et al., 1997a) afirmam que, comparações de linhagens em camundongos têm, não somente sugerido que o perfil basal no “LEC”, difere quantitativamente (Rodgers et al., 1993b; Trullas et al., 1993), mas também qualitativamente [i.e., na estrutura dos fatores; (Holmes et al., 1996)].

Ainda que a utilização de ratos no “LEC” seja muito mais alta do que de camundongos, o número de linhagens dessa última espécie, que têm sido estudada neste modelo é ampla e, obviamente, o aumento na probabilidade de haver diferenças, entre linhagens e/ou na seletividade das linhas genéticas raciais, estão relacionadas à casualidade, e servem para facilitar a interpretação das divergências de um comportamento inato, havendo evidências consistentes, de que os fatores genéticos têm um importante papel, na influência do comportamento basal de camundongos (Hogg, 1996).

Dois pesquisadores (Trullas et al., 1993), compararam o comportamento exploratório, de 16 linhagens de camundongos no “LEC” e observaram uma extensa gama de valores díspares: entre 5 e 80% para % n^o e entre 2 e 90% para % t. Estes autores concluíram, que quando todas as linhagens eram consideradas conjuntamente, aproximadamente 70% das variâncias nestes dois parâmetros (% n^o e % t), poderiam ser atribuídas à fatores genéticos (Hogg, 1996). As diferenças basais na atividade exploratória, examinadas em outro modelo de ansiedade, o teste cruzado preto e branco (caixa preta/branca), foram preditivos, para as desigualdades na sensibilidade da ação ansiolítica, dos agonistas benzodiazepínicos, demonstrando um acréscimo na exploração basal e uma correlação existente, com o aumento da eficácia destes compostos (Crawley et al., 1982).

Em contraste direto com a expectativa, um agente ansiogênico, bastante conhecido, a ioimbina, na verdade, produz no “LEC” um perfil consistente, com uma inequívoca ação ansiolítica (Cole et al., 1995a).

Embora, pudesse ser contestado que, este achado fosse problemático para a presente metodologia, deveria ser notado que (Rodgers et al., 1997a): i) foram observados efeitos anti-ansiedade semelhantes, com a ioimbina, em outros modelos animais, ii) os efeitos no “LEC”, foram verificados em três linhagens de camundongos, iii) a ioimbina, tem alta afinidade por sítios (e.g., 5-HT_{1A}) diferentes dos α_2 -adrenoreceptores, e iv) os α_2 -antagonistas mais seletivos (e.g., idazoxan), são relativamente ineficazes no modelo (Cole et al., 1995a).

Esta análise, sugere que, sob certas condições de teste (alto estresse experimental?), a ioimbina, pode preferencialmente, influenciar mecanismos não-adrenérgicos, para alcançar sua aparente ação anti-ansiedade, sendo linhagem independente (Rodgers et al., 1997a).

Um recente trabalho de revisão (Hogg, 1996), sustenta que, explorando as diferenças basais do “LEC”, nos valores de % n^o e % t, que a seletividade congênita ou as linhagens podem exibir, seria possível prover um modo de favorecer as ações atribuídas, aos compostos ansiolíticos e ansiogênicos.

Embora haja alguma evidência farmacológica, de que esta abordagem possa ser frutífera, os recentes estudos conduzidos à este respeito não são convincentes, porque existem várias manipulações de caráter independente dos farmacológicos e dos genéticos, que podem conduzir a uma modulação dos níveis de estresse do animal que, quando executadas, antes dos ensaios, podem ter profundos efeitos no comportamento (Hogg, 1996). Manobras deliberadas ou acidentais, destes importantes fatores de influência, podem também alterar dramaticamente os efeitos dos fármacos (Hogg, 1996).

Esta mesma autora que, no seu trabalho de pesquisa, recolheu somente 50% das respostas, a um questionário formulado para 65 laboratórios, que utilizam o “LEC”, relata que alojar conjuntamente os animais em caixas, por um período de tempo compreendido entre 30 minutos e sete dias, é uma metodologia empregada rotineiramente por cinco e semi-habitualmente, por um dos laboratórios que responderam ao questionário.

Continuando as suas observações Hogg (1996) faz alusão que, enquanto nenhuma modificação, acerca das avaliações convencionais de ansiedade, foram verificadas após uma, duas ou três semanas, em acomodações de camundongos adultos [12-15 semanas; (Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c)], da linhagem DBA/2, em gaiolas [10 animais/caixa (45x28x13 cm), durante no mínimo quatro semanas; (Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c)], apenas três dias de alojamento isolado, foram suficientes para reduzir a tendência dos camundongos, em explorar as passarelas abertas do “LEC”.

Desta forma, subseqüentemente conduzindo a um aumento significante, dos efeitos ansiolíticos do diazepam e redução dos efeitos ansiogênicos do FG 7142 e DMCM (Jones et al., 1994).

Fatores estressantes agudos, também têm sido relatados, como tendo influência sobre o comportamento, exibido pelos animais no “LEC” (Hogg, 1996), como por exemplo, choque elétrico (Steenbergen et al., 1990), natação forçada (Britton et al., 1991), estresse cirúrgico e administração parenteral de solução salina (Adamec et al., 1991; Lapin, 1995), todos aumentando a ansiedade.

De modo semelhante, o estresse por imobilização (Albonetti et al., 1992; Reddy et al., 1996), a derrota social (Heinrichs et al., 1992; Avgustinovich et al., 1997), a exposição ao gato (Adamec et al., 1993), ao odor de gato (Zangrossi et al., 1992a e b) ou odor co-específico, reduzem o comportamento de exploração dos espaços abertos do “LEC” (Hogg, 1996). Neste contexto, um estudo realizado com camundongos (Pokk et al., 1997), relacionado aos efeitos no receptor benzodiazepínico, de um antagonista, o flumazenil (Ro 15-1799), de um agonista parcial, o Ro 15-4513 e de um agonista inverso, o beta-CCM, sobre o comportamento de um grupo controle e de outro, constituído de animais que foram estressados é oportuno.

O estresse (“small platform stress”), foi induzido posicionando-se o animal, sobre uma pequena plataforma (d = 3,5 cm), circundada de água, por um período de 24 horas (Pokk et al., 1997). Esta técnica envolve diversos fatores de estresse como, privação do sono REM (“rapid eye movement”), isolamento, imobilização e o medo de cair na água e se molhar.

No "LEC" o estresse resultante desta técnica, produz mudanças indicativas de ação ansiolítica, acarretando um aumento na percentagem de entradas nos braços abertos e também na percentagem do tempo despendido sobre eles (Pokk et al., 1997). Em outro trabalho, os mesmos autores (Pokk et al., 1995), investigaram os efeitos sobre o receptor benzodizepínico, de um agonista, o diazepam, de um antagonista, o flumazenil, e de um agonista inverso, o Ro 15-4513, sobre a atividade locomotora e o comportamento dos animais no "LEC", em camundongos privados de sono.

A privação do sono, em camundongos, durante 24 horas, utilizando a técnica da plataforma (veja acima), causou excitação comportamental, que foi refletida por um aumento na atividade locomotora. No "LEC", o diazepam na dose de 2.5 mg/kg obteve um efeito ansiolítico nos camundongos controle, que se refletiu num aumento da percentagem de entradas nos braços abertos e na percentagem do tempo despendido sobre eles. Contrariamente, nos animais privados de sono, o diazepam não induziu nenhuma ação ansiolítica, em qualquer das doses testadas. Na dose mais alta (2.5 mg/kg) o diazepam produziu um efeito sedativo, que foi refletido por um decréscimo no número total de ingressos realizados sobre os braços abertos e fechados do "LEC". Assim, concluem os autores, a privação do sono, induz a uma hiposensibilidade dos camundongos, aos efeitos ansiolíticos do diazepam (Pokk et al., 1995).

Repetir as manipulações relativas ao manejo dos animais, por diversos dias, ou imediatamente antes dos experimentos, auxilia no processo de habituar os mesmos, à um estresse ao qual eles comumente estarão sujeitos na aplicação do “LEC” (i.e., remoção da gaiola, pesagem, administração parenteral), sendo que à respeito deste ponto, constatou-se em um ensaio que, somente um, dos oito agonistas do receptor 5-HT_{1A} e, que um dos sete antagonistas do receptor 5-HT₃, mediarão as respostas ansiolíticas observadas nos ratos, manipulados previamente, por mais de dois dias (Hogg, 1996). Esta redução na sensibilidade do efeito ansiolítico, após o manuseio, é linhagem-independente (Hogg, 1996). Existem diversas publicações de estudos, acerca dos efeitos do manejo regular, sobre as respostas comportamentais à manipulação farmacológica e, corroborando com estes achados, vários autores (Brett et al., 1990; Andrews et al., 1991; Andrews et al., 1993) reportam que a sensibilidade dos efeitos dos benzodiazepínicos, do (RS)-zacopride e do baclofen, foi atenuada após manuseio crônico, e o efeito ansiogênico da buspirona, foi aumentado em ratos, que tinham sido anteriormente manejados (Hogg, 1996).

Embora, um estresse crônico moderado, possa aumentar a % n^o e % t, de maneira a indicar um efeito ansiolítico (Cancela et al., 1994), as mudanças relativas à sensibilidade farmacológica, induzidas pelo manuseio, tem sido observadas igualmente, na ausência de diferenças nos valores basais da exploração, nas passarelas abertas, utilizando-se, a manipulação e, a não-manipulação como veículo, no tratamento dos animais; conseqüentemente, o fenômeno não é puramente matemático (Hogg, 1996).

Estudando-se os efeitos comportamentais em camundongos CD1 [controle, (intactos n= 16; salina n= 14)], com a administração de buspirona (n= 27), ondansetron (n= 28) e tianeptina (n= 28), observou-se que a manipulação e as injeções diárias, por 21 dias, resultaram em mínimos efeitos sobre o comportamento no "LEC" (Rodgers et al., 1997b), confirmando achados anteriores (Rodgers et al., 1997c). Diversos efeitos do manuseio, sobre a atividade do sistema GABA_A/benzodiazepínico, tem também sido reportado (Biggio et al., 1990) e, evidências contraditórias à respeito dos resultados de testes repetidos, em ratos e camundongos, relativas ao seus comportamentos no "LEC", têm surgido (Hogg, 1996). Alguns grupos de pesquisa, tem relatado, com consistência, uma tendência ansiogênica (i.e., redução na % n^o e % t) no segundo experimento, com os mesmos animais (Rodgers et al., 1992b; Griebel et al., 1993b; Rodgers et al., 1993a; Treit et al., 1993), enquanto outros autores (Pelow et al., 1985; Lister, 1987; File et al., 1990), observam que testes repetidos, não alteram o comportamento basal no "LEC" (Hogg, 1996).

Posteriormente, investigações de File e colaboradores, revelaram significativa redução da atividade dos animais, na segunda exposição ao "LEC", relacionada as vielas abertas, mas não às fechadas (Hogg, 1996). Uma exposição ao odor de gato, quatro dias antes da aplicação do "LEC", não afetou o comportamento de ratos, no primeiro ensaio, entretanto, houve uma diminuição na % n^o e % t, quando estes animais foram expostos ao "LEC" pela segunda vez (Hogg et al., 1994).

Adicionalmente, ratos que sofreram uma canulação no núcleo central (uma semana antes da primeira exposição ao “LEC” e duas semanas antes da segunda exposição), mostraram significativa redução na exploração dos braços abertos, no segundo experimento (File et al., 1996).

Este início de habituação do comportamento, entre o primeiro e o segundo experimento, não é uma variação nas condições do teste padrão, *per se*, como relataram alguns autores (File et al., 1990; Hogg et al., 1994; File et al., 1996) sobre seus experimentos, que foram efetuados no mesmo laboratório, utilizando o mesmo “LEC”, sob condições idênticas (Hogg, 1996). Portanto, usando-se as mesmas situações laboratoriais, parece que somente os ratos são altamente estressados, previamente ao teste, reduzindo o comportamento exploratório, nos braços abertos do “LEC”, no segundo ensaio (Hogg, 1996). Os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos, são atenuados no segundo experimento com o “LEC” (Lister, 1987; File et al., 1990; Rodgers et al., 1992b; File et al., 1993; Treit et al., 1993), tanto nos ratos como nos camundongos (Hogg, 1996).

Este efeito é independente do tratamento, na primeira exposição (File et al., 1990), embora ele seja observado somente nos animais que foram previamente habituados à manipulação (File et al., 1992). A sugestão de que o aumento da manipulação e/ou do estresse, anteriormente ao teste, simplesmente atenuam as respostas comportamentais, à administração de benzodiazepínicos e ao próprio labirinto, é refutada por evidências provenientes de uma análise de fatores realizada em estudos (File, 1993; Fernandes et al., 1996), que demonstraram que a avaliação tradicional da ansiedade (% n^o e % t), obtidas de duas diferentes experiências no “LEC”, repousam sobre fatores diversos e, assim, representam

diferentes componentes da ansiedade (Hogg, 1996). Conseqüentemente, o segundo ensaio não é um modelo do mesmo estatus do primeiro, ao invés disso, representa uma condição, na qual os benzodiazepínicos não são eficazes (Hogg, 1996). Uma evidência adicional, relacionada a teoria da redução da sensibilidade, está presente em um recente trabalho, onde a administração de 8-OH-DPAT, um agonista do receptor 5-HT_{1A}, diretamente dentro do núcleo dorsal da rafe do rato, resultou em resposta ansiolítica, somente no segundo experimento no “LEC” (File et al., 1996).

Os benzodiazepínicos têm, não somente propriedades ansiolíticas, mas também amnésicas (Beuzen et al., 1995), tanto no homem (Lister, 1985) como nos animais (Thiebot, 1985) e, convém notar que a maioria dos estudos animais, concluem que o efeito amnésico dos ansiolíticos, tem sido empreendidos em modelos, envolvendo choques elétricos, como o teste de esquiva passivo (“passive avoidance test”) ou em situações comportamentais, nas quais os animais são forçados à entrar em ambientes novos [habituação à novos meio-ambientes; (Verfaul et al., 1986)]. Conseqüentemente, todos estes testes, possuem um forte componente emocional (Misslin et al., 1986) e desse modo existe uma dificuldade, em se diferenciar entre, um efeito direto do benzodiazepínico sobre a memória ou um efeito indireto, via ansiedade (Beuzen et al., 1995). Assim, parece impossível uma modificação farmacológica no nível de ansiedade, sem afetar a memória, e dado a importância dos tratamentos ansiolíticos, merece consideração esclarecer estas relações (Beuzen et al., 1995).

Como foi mencionado por Lister (1985), os testes relacionados à ansiedade, mais amplamente utilizados em animais, visando avaliar o “estado de ansiedade”, juntamente com a execução de uma recente pesquisa (Belzung et al., 1994), demonstrou, que os parâmetros registrados no “LEC”, no “holeboard”, na caixa preta/branca e no teste de exploração livre, não refletem o mesmo estado psicológico (Beuzen et al., 1995). O termo “memória”, por outro lado, envolve uma extensa série de conceitos, sendo que um grande número de testes avaliam este fenômeno (Beuzen et al., 1995). Uma classe de memória, associada aos eventos emocionais (memória emocional), é avaliada através do teste de esquiva passivo, que é muito sensível aos efeitos dos compostos ansiolíticos (Beuzen et al., 1995).

Adicionalmente, esta questão é igualmente de interpretação mais complexa, uma vez que diversos estudos mostram uma grande variabilidade nas respostas, de diferentes linhagens de camundongos, nos testes de memória (Jaffard et al., 1991; Rouillet et al., 1992; Rouillet et al., 1993).

Mais recentemente, diante das reações neofóbicas, exibidas por camundongos Balb/c, confrontados com o modelo de livre exploração, Beuzen et al. (1995), formulam a proposta de que este modelo é útil para avaliar as “facetas” da ansiedade (Griebel et al., 1993a), enquanto que os outros acima mencionados, possuem serventia para computar os “estados de ansiedade”, visto que estes autores confirmaram que o comportamento dos camundongos, registrado nos testes de ansiedade, não refletiam o mesmo estado psicológico, e mostraram que a memória emocional está ligada ao “estado de ansiedade”, porém não as suas “facetas”.

Enquanto isso, recentes estudos tem sugerido que o elevado “LEC”, pode também ser útil na avaliação do aprendizado e da memória, tanto em camundongos (Itoh et al., 1990; Itoh et al., 1991; Sharma et al., 1992; Lapin, 1995), como em ratos (Sharma et al., 1992), já que o procedimento utilizado para avaliar o aprendizado e a memória é simples e não requer nenhum treinamento, nem o uso de privação de alimentos/água ou punição, como choque elétrico (Miyazaki et al., 1995). Estes trabalhos utilizam a latência de transferência (TL), o tempo que o animal consome, para deslocar-se do braço aberto para o braço fechado, como um índice de aprendizado e memória (Miyazaki et al., 1995). Contudo, estas pesquisas não investigam, em detalhes, os efeitos da emoção sobre o “LEC”, na avaliação do aprendizado e da memória (Miyazaki et al., 1995). Alguns resultados obtidos em um experimento (Miyazaki et al., 1995), são dignos de nota, como por exemplo, o TL no dia 2, foi menor do que no dia 1, no “LEC” a uma altura de 40 cm, e não foi afetado, por drogas ansiolíticas e ansiogênicas, tais como 8-OH-DPAT (0.4 mg/kg), picrotoxina (2.0 mg/kg) e FG 7142 (20.0 mg/kg), porém foi afetado pelo diazepam (8.0 mg/kg). Por outro lado, o TL no dia 2, foi prolongado pela mudança da sala experimental, entre o dia 1 e o dia 2. Os autores concluem, sugerindo que o “LEC”, pode ser usado na avaliação do aprendizado e da memória, sem a influência de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (Miyazaki et al., 1995).

Os animais controle, sejam camundongos ou ratos, utilizados nos ensaios sobre comportamento no "LEC", revestem-se de particular importância, visto que estes comportamentos são motivados por, no mínimo, três fatores: atividade locomotora exploratória, "reflexo de toca" ("hole reflex"- evasão dos roedores para uma área menos iluminada e mais restrita) e "ansiedade" (Lapin, 1995). Cada um destes fatores, *a priori*, podem ser afetados por estímulos externos, como manipulação dos animais e administração parenteral de drogas e de veículos (Lapin, 1995). Embora estes fatores experimentais estressantes, tenham sido estudados recentemente no "LEC" (Adamec et al., 1991), os dados foram obtidos com ratos em intervenções crônicas (e não agudas), previamente à aplicação do "LEC" (Lapin, 1995).

Estruturada nestas razões, foi conduzida uma pesquisa (Lapin, 1995), utilizando 110 camundongos suíços, investigando, os efeitos de, uma única manipulação (contenção dos animais por 5 seg., tempo necessário para uma injeção i.p.), da administração injetável simulada (somente a introdução de uma agulha acoplada a seringa vazia, i.e., sem injetar nenhuma substância, via i.p.) e da administração de injeção intraperitoneal (i.p.), de solução salina (1% do peso corporal), sobre o comportamento de camundongos no "LEC". De qualquer forma, foi verificado que, uma injeção intraperitoneal de solução fisiológica (salina) diminuiu, de maneira significativa (vs camundongos intactos), a proporção do número de entradas nos braços abertos, de modo superior ao total de ingressos nas ruelas abertas e fechadas, e prolongou significativamente o tempo despendido nos caminhos fechados (Lapin, 1995). Estes dois efeitos são considerados como sendo típicos de drogas indutoras de ansiedade (ansiogênicas) (Lapin, 1995).

O tempo despendido nas vielas abertas e a interseção permaneceu inalterado. A injeção de salina, significativamente reduziu a latência do animal, em alcançar um dos braços fechados, com a finalidade de se livrar de um braço aberto. A manipulação, a injeção simulada e a injeção verdadeira, significativamente diminuíram, a redução da latência, num segundo experimento (vs a latência no primeiro), um parâmetro usado como um critério relativo ao aprendizado e a memória (Lapin, 1995).

Assim, os grupos tratados com salina, considerados como controles, nos experimentos farmacológicos, possuem um perfil comportamental de animais estressados e ansiosos no "LEC" (Lapin, 1995).

Diversamente, em um outro teste comportamental, sensível ao estresse, a natação forçada, utilizando camundongos suíços, concluiu-se que repetidas injeções de veículo, não alteravam o comportamento desses animais (Hilakivi-Clarke, 1992). Outros autores (Brett et al., 1990), relatam que o manejo repetido por 28 dias, não reduziu a ansiedade em ratos, submetidos ao "LEC", mas eliminou a ação ansiolítica do diazepam, sugerindo que o manuseio altera a resposta do receptor benzodiazepínico. Enquanto que em uma outra pesquisa (Falter et al., 1992), os resultados mostram que em ratos machos Sprague-Dawley, nenhum efeito do meio-ambiente (nível de luminosidade, configuração espacial, altura do "LEC") ou estresse comportamental (imersão parcial em água, imobilização forçada, choque elétrico) sobre o comportamento no "LEC", foi detectado (Hogg, 1996).

O teste da caixa preta/branca é utilizado para provocar estímulos de aversão (Hogg, 1996), uma vez que a inclinação natural dos roedores é a de se esquivar de áreas iluminadas (Lapin, 1995), em favor daquelas escuras (Crawley et al., 1982). A luminosidade também é, portanto, um dos fatores que reduzem a interação entre dois ratos (Hogg, 1996), uma condição desconhecida do teste de interação social (File, 1980). A elevação do nível de luz no "LEC", tem sido relatada (Hogg, 1996) como estando associada a um aumento na esquivança, relativa aos braços abertos (Griebel et al., 1993b); porém, este não é um fato observado regularmente (Baldwin et al. 1986; Handley et al., 1993b). De qualquer forma, em um estudo (Handley et al., 1993b), notou-se que, quanto ao comportamento basal, o efeito ansiogênico da 8-OH-DPAT ocorreu em luminosidade baixa, modificando para ansiolítico na presença de iluminação mais alta (Hogg, 1996).

Obviamente, a intensidade da claridade é um parâmetro de avaliação relativo e, provavelmente naqueles animais testados sob luz muito ativa, em relação àqueles mantidos em seus alojamentos, os primeiros irão exibir uma ansiedade basal mais alta, do que àqueles que são testados em luminosidade mais baixa, conseqüentemente demonstrando um aumento na sensibilidade aos fármacos ansiolíticos (Hogg, 1996). A iluminação muito intensa, gera condições mais aversivas na aplicação do "LEC", modificando a sensibilidade do modelo, acerca do potencial ansiolítico, sobretudo para drogas não-benzodiazepínicas, que torna-se mais elevado pelo possível estresse produzido nestas situações (Rodgers et al., 1997a).

Neste ponto, é digno de nota acusar o recente (abril de 1998) recebimento de uma resposta, via "e-mail", à uma consulta realizado por mim, também através de "e-mail", ao Dr. John Rodgers, da Universidade de Leeds (U.K.).

Este renomado pesquisador e professor de Farmacologia Comportamental, assevera que em relação ao nível de claridade, existem diversos pontos relevantes à serem considerados: 1. Nós, diz Rodgers, alojamos nossos animais (camundongos) sob condições de ciclo de luz, revertida à cada 12 horas (a iluminação é acionada às 1900 h e interrompida às 0700 h) e os submetemos à aplicação do teste "LEC", durante o meio do ciclo LD ["Light-Dark"– "mid-dark phase" (1000-1400 h)]. Este procedimento, permite testar os camundongos, durante o período ativo desses animais noturnos. Durante o teste, nós também iluminamos o laboratório, com luz de coloração vermelha (fosca) sem brilho (4 x 60 W, indireta), visto que nós achamos que os níveis de atividade, nos braços abertos, foram extremamente baixos, sob luz ambiente branca normal. 2. À um nível mais geral, a maioria dos laboratórios, NÃO mantêm seus animais sob ciclo de iluminação revertido; testando os animais no período mais claro ("mid-light phase"), sob luz ambiente normal. 3. Basicamente, os níveis de atividade nas vias abertas, variam dependendo da espécie e linhagem, que você está usando, disse-me.

Idealmente, para permitir uma detecção de reduções, bem como de aumentos, nas entradas nas ruelas abertas e no tempo despendido nelas, você necessita de condições de teste, as quais fidedignamente produzam valores médios, de % de ingressos nos ramos abertos e % de tempo despendido nas vias abertas, ao redor de 20-40%.

4. Se você não tem experiência prévia na utilização do “LEC”, você irá necessitar conduzir uns poucos estudos pilotos, visando determinar ótimas condições de teste, para produzir os registros descritos acima (Cole, 1998, correspondência pessoal).

A hora do dia, na qual for conduzido o teste, pode também ser muito importante (Hogg, 1996), porque os níveis basais de % n^o e % t estão diminuídos, juntamente com uma redução na tendência à exploração do labirinto, se o teste for realizado durante o período da tarde (Griebel et al., 1993b). Lapin (1995), aplicando o “LEC” em experimentos, realizados entre 11 a.m. e 2 p.m., não observou diferenças significantes, no comportamento de 90 camundongos neste horário, verificando que não houve, portanto, nenhum efeito sobre o ritmo circadiano desses animais (embora o ciclo de 12:12 h de claro/escuro tenha início as 7:00 a.m., quando as luzes são acesas).

Dentre as variáveis não farmacológicas que podem influenciar o comportamento espontâneo no elevado “LEC”, no mínimo duas (a saber, a largura e o nível de transparência dos braços do “maze”), não tem sido avaliadas a respeito, de possíveis conseqüências sobre a atividade basal (Lamberty et al., 1996).

Por esta razão, os autores, investigaram o efeito da largura (5, 7 ou 9 cm) e o nível de transparência (cinza vs transparente), nos ramos do “LEC”, sobre a atividade padrão de camundongos, das linhagens NMRI e C57/BL 10j, baseado naquele descrito por Lister (1987).

Os resultados indicaram uma clara diferença, entre as linhagens, relativa ao comportamento espontâneo, nas vias abertas/fechadas, com os camundongos C57/BL, que não executaram visitas sobre os caminhos abertos do "LEC" (Lamberty et al., 1996).

À propósito desta observação, outro trabalho (Avgustinovich et al., 1997), utilizando camundongos da linhagem C57/BL/6J, verificou que raramente eles passam de um braço fechado para outro. Corroborando com estes achados, outra pesquisa (Pick, 1996), que investigou os efeitos antinociceptivos de um dos mais prescritos benzodiazepínicos, o alprazolam, em grupos de camundongos das linhagens CD-1, SWISS, BALB/c e C57BL, conclui que nenhuma analgesia foi observada nas linhagens CD-1 ou C57BL. De acordo com o estudo anterior (Lamberty et al., 1996), na linhagem NMRI, o alargamento dos braços, resultou em um aumento significativo, da movimentação nos ramos abertos, porém o nível de transparência, não afetou os parâmetros comportamentais. Nos camundongos C57/BL, nenhuma mudança comportamental significativa, foi detectada após o aumento da largura do braço; contudo, o "LEC" com o piso transparente, aumentou significativamente, a latência dos animais, em mover-se e reduziu a ambulação (Lamberty et al., 1996). Finalmente, empregando-se o "LEC", com as ruelas fechadas transparentes e as abertas cinzas, produziu-se uma ambulação, dos camundongos C57/BL, sobre as vias abertas, um comportamento que não foi observado normalmente, com esta linhagem, quando se utilizou uma transparência uniforme no "LEC" (Lamberty et al., 1996).

Segundo Hogg, (1996), os resultados do questionário, enviado por ela à 65 laboratórios diferentes, que utilizam o "LEC" na rotina, indicam que houve uma variedade de materiais divergentes, usados na construção do aparato. Estudos mais elaborados não tem sido realizados, visando comparar a influência destas variáveis, no resultado do comportamento, entretanto, alguns autores (Rodgers et al., 1995c) comentam, que este pode ser um fator contribuinte, na promoção de desigualdades encontradas na aplicação do "LEC" (Hogg, 1996). Todavia, outros pesquisadores (File et al., 1990) observaram que a redução na eficácia dos benzodiazepínicos, no segundo experimento, não foi dependente do material empregado na construção do labirinto (Hogg, 1996).

A adição de bordas ao redor do perímetro das passarelas abertas, objetivando reduzir o número de animais que caem destes braços, tem sido rotineiramente utilizados por 54% daqueles pesquisadores, que responderam ao questionário (Hogg, 1996) e usavam papelão e por 21% daqueles que empregaram madeira. Diversos autores (e.g., Lister, 1987; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c) utilizaram acrílico transparente, tendo o piso na coloração preta e as paredes dos braços fechados transparente.

Conforme Lister (1987), a principal diferença entre o aparato utilizado por Pellow et al. (1985), em seu trabalho com ratos e a versão, em menor escala, usada com camundongos, é de que a lateral das paredes do “LEC”, feita com acrílico transparente, é preferível em relação a madeira, sendo que esta modificação, propiciou assegurar que o nível de luminosidade, tanto nos caminhos abertos, quanto nos fechados fosse aproximadamente o mesmo.

Enquanto que o material empregado na construção, pode não influenciar mudanças na sensibilidade, a adição de bordas afeta o resultado das manipulações farmacológicas, através da redução dos efeitos ansiolíticos (Hogg, 1996), por exemplo dos benzodiazepínicos (Jones et al., 1994; Fernandes et al., 1996) e num aumento dos efeitos ansiogênicos, como por exemplo, do FG 7142 e DMCM (Jones et al., 1994). Entrementes, em um estudo realizado através de uma análise fatorial, chegou-se a conclusão, de que estas diferenças, são provavelmente devidas as expressões de diferentes tipos de ansiedade, sem relação com a construção do labirinto, com e sem bordas (Fernandes et al., 1996).

Uma parcela considerável de autores (e.g., Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c) utilizam bordas com elevação de 0,25 cm.

Hogg (1996) assevera que no delineamento do questionário, fica implícita a suposição de que todos os labirintos foram construídos, de acordo com as dimensões preconizadas por Pellow et al. (1985) e Lister (1987), para ratos e camundongos respectivamente.

Assim, a maior parte dos pesquisadores (e.g., Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c) edificam o elevador “LEC” para camundongos nas seguintes medidas: dois braços abertos (30x5 cm), e dois fechados (30x5x15 cm), emanados de uma plataforma ou praça central comum (5x5 cm), modelando um formato de cruz. Todo aparato eleva-se entre 40-60 cm (e.g., Lister, 1987; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c) acima do nível do solo.

Enquanto que a maioria dos autores, tem seguido estes critérios (ou os modificando, somente em pequena percentagem), existem, incidências na variação (Hogg, 1996), como por exemplo, a construção de um labirinto empregando, papelão preto, com braços que mediam 15x45 cm e paredes de 10 cm de altura (Wright et al., 1992), ou então outro, que possuía braços abertos de 18 cm de extensão (Becker et al., 1994).

Em relação ao ambiente controlado do alojamento dos camundongos, em geral os pesquisadores situam as condições de temperatura ao redor de $21\pm 3^{\circ}$ C, (e.g., Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c) e alguns determinam também a umidade relativa do ar em torno de $55\pm 5\%$ (e.g., Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c), ao passo que a alimentação/água é *ad libitum*.

Quanto ao peso dos camundongos, este gira por volta de 20-45 g. (e.g., Lister, 1987; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c).

O determinante crítico mais importante, no resultado dos estudos com “LEC”, é o método que foi adotado, para se agregar escores ao comportamento animal no labirinto, objetivando determinar valores numéricos, nos quais se baseiam as conclusões (Hogg, 1996). Normalmente, a % n^o e a % t, relativas aos braços abertos, são consideradas conjuntamente, e a definição do que constitui um ingresso no braço é absolutamente importante (Hogg, 1996).

Pellow et al. (1985), Lister (1987) e muitos outros pesquisadores (e.g., Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c), determinam que uma entrada na ruela, só ocorre quando o animal sai da plataforma central, estando posicionado voltado para um braço aberto (e.g., Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1992b; Cole et al., 1993; Rodgers et al., 1993a; Rodgers et al., 1993b; Cole et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Lapin, 1995; Miyazaki et al., 1995; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c) e, desloca-se para dentro de um dos caminhos, com todas as quatro patas, embora outros autores (Vasar et al., 1993), classificam entradas nas vielas, quando os animais ingressam somente com as patas dianteiras [membros torácicos;(Hogg, 1996)].

As técnicas automatizadas, que geralmente funcionam, através do registro da contagem, realizadas nas interrupções dos feixes de luz, instalados no caminho que os animais utilizam, nos braços do labirinto (Hogg, 1996), são sensíveis a introdução do focinho, da cauda, das patas dianteiras e, por esta razão, revelam dados inconsistentes, sobretudo quando o pesquisador quer se basear nos critérios, relacionados ao apoio integral das quatro patas.

Não há uma fórmula mágica para a utilização do elevado "LEC", contudo, a regra geral é a de que aquelas linhagens de camundongos, que forem mais ansiosos ou estressados, anteriormente ou pela administração de fármacos, são provavelmente os que exibem respostas mais profundamente ansiolíticas, e devem ser empregados (Hogg, 1996).

2.5. ANSIEDADE E SUAS INTERAÇÕES COM O SISTEMA GABAÉRGICO.

INTRODUÇÃO.

Segundo Rang et al. (1997), existem duas razões pelas quais a compreensão da ação das drogas no sistema nervoso central (SNC), apresenta um problema particularmente controverso. A primeira é que as drogas de ação central têm significado especial para a espécie humana.

Elas não só se revestem de importância clínica e terapêutica fundamental, como são também as drogas que os seres humanos mais comumente administram a si próprios sem a intervenção do profissional de saúde (por exemplo, álcool, chá e café, maconha, nicotina, opiáceos, anfetaminas e ansiolíticos, dentre outras). A segunda razão é que o sistema nervoso central é funcionalmente muito mais complexo do que qualquer outro sistema do organismo, e isto torna a compreensão dos efeitos da droga muito mais difícil. Nos últimos anos, a investigação dos efeitos celulares e bioquímicos produzidos por drogas de ação central progrediu rapidamente, porém o abismo entre a descrição da ação das drogas neste nível e a descrição das drogas em nível funcional e comportamental permanece, na sua maior parte, muito amplo. Ao mesmo tempo, a quantidade de tipos de receptores distintos para muitos dos agentes transmissores conhecidos aumentou. Para todos os principais transmissores, parece haver três ou quatro (ou mais) subtipos de receptores separados, freqüentemente com padrões muito distintos de distribuição dentro do cérebro (Rang et al., 1997).

Por outro lado, o conceito de neurotransmissor ampliou-se consideravelmente. O conceito original considerava uma substância liberada por um neurônio e agindo rapidamente, de forma breve e em curta amplitude, sobre a membrana de um neurônio adjacente, produzindo uma alteração na condutância que aumentava ou diminuía a excitabilidade da célula pós-sináptica (Rang et al., 1997).

Está claro, atualmente, que os mediadores químicos dentro do encéfalo podem produzir efeitos lentos e de longa duração (durante minutos ou horas); que eles podem agir muito difusamente, em uma distância considerável do seu local de ação; e que podem produzir efeitos diversos, como, por exemplo, na síntese do transmissor e na expressão dos receptores dos neurotransmissores, além de afetarem a condutância iônica das células pós-sinápticas (Rang et al., 1997).

O termo “neuromodulador” (“neurorregulador”) foi criado para denotar um mediador liberado neuronalmente, cujas ações são incongruentes com a visão convencional de como um neurotransmissor deve agir (Rang et al., 1997).

O termo “neuromodulador” é difícil de definir, e corre o risco de ser utilizado indiscriminadamente para descrever qualquer mediador químico cujas ações sejam mal compreendidas. Ele abrange não apenas os mediadores de neuropeptídeos, que em geral agem lenta e remotamente de onde são liberados, mas também mediadores como os metabólitos do óxido nítrico e do ácido araquidônico, que não são armazenados e liberados como neurotransmissores convencionais, podendo proceder tanto de células não neuronais quanto de neurônios. Em geral, a neuromodulação descreve o controle da plasticidade sináptica, inclusive eventos de curta duração, como a regulação da liberação do transmissor pré-sináptico ou a excitabilidade pós-sináptica, e eventos de duração mais prolongada como a regulação genética neuronal (Rang et al., 1997).

ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO (GABA).

Sintetizado em 1883, o ácido gama-aminobutírico (GABA) foi conhecido por vários anos como sendo um produto do metabolismo microbiológico e vegetal (Cooper et al., 1996). Ao redor de 1950, alguns pesquisadores identificaram o GABA como um constituinte normal do sistema nervoso central de mamíferos e, atualmente mais de 45 anos depois, ainda não é preciso o papel que este composto desempenha no SNC destes animais (Cooper et al., 1996).

Não obstante, diversas evidências tem sido acumuladas, corroborando com a hipótese de que a principal ação do GABA no encéfalo, repousa no seu efeito como neurotransmissor inibitório (Cooper et al., 1996). Este conhecimento impulsiona, hoje em dia, prodigiosas pesquisas que esforçam-se para implicar o GABA na etiologia de várias desordens neurológicas e psiquiátricas (Cooper et al., 1996). Embora as evidências não sejam absolutamente esmagadoras, sabe-se que o GABA está envolvido, direta e indiretamente, na patogênese da doença de Huntington, de Parkinson, na epilepsia, no estresse, na ansiedade, na esquizofrenia, nas disquinesias tardias e na demência senil (Cooper et al., 1996).

O GABA ocorre no tecido encefálico e na medula espinhal, porém não em outros tecidos de mamíferos, exceto em quantidades mínimas [e.g. fígado, baço e coração (Cooper et al., 1996)].

No encéfalo ele é particularmente abundante (aproximadamente 10 $\mu\text{mol/g}$ de tecido); no sistema nigrostriatal, porém, ocorre em concentrações menores (2 a 5 $\mu\text{mol/g}$) em toda a substância cinzenta (Rang et al., 1997).

Enquanto as monoaminas são expressas em nmol/g, o GABA no SNC encontra-se na ordem de $\mu\text{mol/g}$, e é especialmente interessante o fato do cérebro também conter uma ampla quantidade de ácido glutâmico (8 a 13 $\mu\text{mol/g}$), que é o principal precursor do GABA e, é ele próprio, um candidato a neurotransmissor (Cooper et al., 1996).

No rato, o corpore quadrigemina e a região diencefálica albergam elevados níveis de GABA, ao passo que baixas concentrações são encontradas nos hemisférios cerebrais, na ponte e na medula; a substância branca contém relativamente reduzidas concentrações (Cooper et al., 1996).

O GABA é formado a partir do glutamato (ácido glutâmico) pela ação da ácido glutâmico descarboxilase (AGD), uma enzima que tem sido utilizada com marcadores imuno-histoquímicos para mapear a distribuição dos neurônios GABA-sintetizadores no encéfalo (Rang et al., 1997).

O GABA é destruído por uma reação de transaminação, na qual o grupo amino é transferido para o ácido α -oxoglutárico (para produzir glutamato), com a produção de semi-aldeído succínico e, em seguida, de ácido succínico.

Esta reação é catalisada pela GABA-transaminase (GABA-T), uma enzima difundida que parece estar localizada na mitocôndria. Os neurônios GABAérgicos apresentam um sistema de captação de GABA ativo, e é este, e não a GABA-T, que remove o GABA após ele ter sido liberado (Rang et al., 1997). Um progressivo aumento dos níveis de GABA e da atividade da AGD parece ocorrer em várias regiões do encéfalo durante o desenvolvimento.

Desta maneira, altos níveis de GABA encontrados em diversas áreas do encéfalo de macacos, sugere existir uma correlação positiva com a atividade da AGD nestas regiões. Esta correlação aparentemente não ocorre com a GABA-T, já que o globo pálido e a substância negra, que possuem elevados níveis de GABA, tem uma atividade relativamente baixa desta transaminase. Por outro lado, áreas como o núcleo denteado e colículo inferior que possuem relativamente grandes concentrações de GABA, tem também uma alta atividade de GABA-T (Cooper et al., 1996).

Tobin e colaboradores (apud Cooper et al., 1996) demonstraram que o encéfalo contém duas formas de AGD, que diferem no tamanho, na seqüência de aminoácidos, na antigenicidade, na localização celular e subcelular e na interação com o co-fator piridoxal fosfato (PLP).

Estas formas, AGD₆₅ e AGD₆₇, derivam de dois genes distintos e a síntese do GABA pela AGD é regulada primariamente através da sua interação com o co-fator PLP. Da AGD total do cérebro de rato, cerca de 50% é apo-AGD, quer dizer, não é ligada ao PLP, sendo assim, enzimaticamente inativa. A menor forma de AGD (AGD₆₅), compõe a maioria do reservatório de apo-AGD no cérebro, enquanto que a forma maior de AGD (AGD₆₇) é quase que saturada com PLP. Sob condições de despolarização, o PLP associa-se com a apo-AGD gerando uma forma ativa, denominada holo-AGD, sugerindo que o aumento da atividade neuronal, causa uma elevação na síntese do GABA, via ativação da AGD (Cooper et al., 1996).

A GABA-T, diferentemente da AGD, abrange uma extensa distribuição tecidual, e conseqüentemente, embora o GABA não possa ser formado fora do SNC, o GABA exógeno pode ser rapidamente metabolizado nos tecidos, tanto do SNC como do periférico (Cooper et al., 1996).

Esta transaminase também requer a mesma co-enzima que a AGD utiliza como co-fator para realizar a sua atividade: a PLP, e parece que esta coenzima tem uma ligação mais estreita com a GABA-T do que com a AGD, já que a relação cerebral relacionada a atividade entre GABA-T/AGD quase sempre é maior que um. Sabe-se que a AGD encontra-se em íntima associação com o sinaptossoma, enquanto que a GABA-T é largamente agregada à mitocôndria, sendo que esta distribuição tem sugerido que a liberação mitocondrial nos sinaptossomas têm menor atividade, propondo assim, que as mitocôndrias localizadas nas terminações nervosas possuem uma pequena atividade relacionada a GABA-T. Este achado levou a especulação de que o GABA é largamente metabolizado nos sítios intercelulares extraneuronais ou em neurônios pós-sinápticos (Cooper et al., 1996).

A semi-aldeído succínico desidrogenase cerebral (SASD) é uma terceira enzima engendrada neste complexo, sendo encontrada paralelamente à distribuição da GABA-T. A maior atividade desta enzima é observada no hipotálamo, núcleos de base, área cortical da substância cinzenta e tegumento mesencefálico (Cooper et al., 1996).

Considera-se que o GABA funcione como um transmissor inibitório em muitas vias diferentes do sistema nervoso central. Os estudos mais detalhados foram realizados no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo e striatum. Na maioria das situações, o GABA é encontrado em interneurônios curtos (internunciais), sendo os únicos tratos GABAérgicos longos aqueles que seguem para o cerebelo e o striatum (Rang et al., 1997).

A distribuição difusa do GABA e o fato de virtualmente todos os neurônios serem sensíveis ao seu efeito inibitório sugerem que a sua função é ubíqua no cérebro. Tem sido estimado que o GABA serve como um transmissor em aproximadamente 30% de todas as sinapses no SNC (Rang et al., 1997).

Uma ocorrência que deve ser considerada é o fato de que os níveis endógenos de GABA aumentam rapidamente no postmortem: alcançando 30-45% a mais, dentro de dois minutos após a morte nos tecidos do rato, sendo necessário um congelamento instantâneo "in situ" (Cooper et al., 1996), para sua posterior avaliação. Outro fator que chama a atenção, é de que o GABA não penetra com facilidade a barreira hemato-encefálica (BHE), sendo extremamente difícil, senão impossível, o aumento de suas concentrações no cérebro através da administração periférica deste composto (Cooper et al., 1996).

RECEPTORES DE GABA.

O termo "receptor GABA" usualmente refere-se ao reconhecimento do sítio do GABA, localizado em áreas pré e pós-sinápticas da membrana, que quando acoplado com o GABA ou um agonista, causa uma mudança na permeabilidade da membrana à ions inorgânicos, primariamente o cloro (Cooper et al., 1996). Entre os vertebrados, os receptores GABA foram encontrados inicialmente nas membranas celulares nervosas, sendo suficientemente distribuídos, tanto que a maioria dos neurônios no SNC os possui, apesar de não estarem associados exclusivamente com eles; estes receptores podem ser expressos nos astrócitos, onde parecem estar envolvidos com a regulação dos canais de cloro. Interessantemente, os GABA-receptores foram descobertos também externamente ao SNC, em neurônios do sistema nervoso autônomo (Cooper et al., 1996).

De acordo com Rang et al. (1997), quando foi reconhecida a importância do GABA como transmissor inibitório considerou-se provável que uma substância semelhante ao GABA poderia provar-se eficaz no controle da epilepsia e de outros estados convulsivos; como o próprio GABA falha em penetrar na barreira hematoencefálica (BHE), uma pesquisa foi iniciada à procura de análogos do GABA mais lipofílicos. Uma dessas substâncias é o derivado p-clorofenil do GABA (baclofen), introduzido em 1972 (Bowery, 1982). Contudo, diferenças entre as ações do GABA e do baclofen logo se tornaram evidentes.

O baclofen [contrariamente, segundo Cooper et al. (1996). o baclofen é um agente que, em adição a vários outros efeitos, causa a liberação do GABA de seus estoques intracelulares, razão pela qual, é muitas vezes classificado incorretamente como agonista do GABA], da mesma maneira que o GABA, inibe a liberação do transmissor de muitos tipos de terminal nervoso, porém, ao contrário do GABA, possui pequeno efeito inibitório pós-sináptico. Além disso, o efeito inibitório pós-sináptico do GABA é bloqueado competitivamente pela droga convulsivante bicuculina [(antagonista GABA, atuando de modo competitivo e diretamente a nível do receptor) Cooper et al., 1996], porém as ações do baclofen não são antagonizadas. Outras substâncias semelhantes ao GABA [por exemplo, muscimol (3-hidroxi-5-aminometilisoxazole)] produzem os efeitos pós-sinápticos bicuculina-sensíveis do GABA, mas não os efeitos pré-sinápticos bicuculina-resistentes. Assim, os primeiros efeitos foram apontados para os receptores de GABA_A, e os últimos, para os receptores GABA_B (Simmonds, 1983; Bowery, 1993).

Em concordância com Cooper et al. (1996), os agonistas que são capazes de ativar diretamente os receptores GABA bicuculina-sensíveis, podem ser subdivididos em dois grupos, baseados nas suas habilidades em penetrar a barreira hemato-encefálica, ditando se eles serão ativos ou inativos após administração sistêmica. Agentes tais como o ácido 3-aminopropanesulfônico, ácido β-guanidinopropionico, ácido 4-aminotetrolico, ácido *trans*-4-aminocrotonico e ácido *trans*-3-aminociclopentane-1-carboxílico são todos efetivamente agonistas GABA de ação direta.

Entretanto, o ingresso destes compostos dentro do cérebro após uma administração sistêmica é mínimo. Além disso, substâncias como o ácido *trans*- 4-aminotetrolico e o ácido 4-aminocrotonico também inibem a GABA-T e a captação do GABA; conseqüentemente, suas ações não são totalmente atribuídas à suas propriedades de agonistas diretos. Contrariamente a esta classe, o segundo grupo listado abaixo, atravessa a barreira hemato-encefálica e são ativos após administração sistêmica. O muscimol é o agente deste último grupo que tem sido mais extensivamente estudado.

Alguns outros compostos deste grupo incluem (5)-(-)-5-(1-aminoetil)-3-isoxazole, THIP (um análogo bicíclico do muscimol), SL-76002 (a[cloro-4-fenil]fluor-5-hidroxi-2 benzilide-neamino-4H butiramida) e amina kojic (2-aminometil-3-hidroxi-4H-piran-4-ona) (Cooper et al., 1996).

Os estudos eletrofisiológicos da ação do GABA nos neurônios do SNC (Bormann, 1988) mostraram que seu efeito inibitório pós-sináptico é mediado principalmente pelos receptores GABA_A, que estão acoplados diretamente aos canais de ânions, e assim causam um aumento na permeabilidade ao cloreto da membrana pós-sináptica; isto tem o efeito de reduzir a despolarização produzida pela ação do transmissor excitatório. Os receptores GABA_B, por outro lado, estão localizados principalmente nos terminais pré-sinápticos, pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e atuam através de segundos mensageiros intracelulares.

Os resultados finais são uma condutância ao K^+ aumentada (causando hiperpolarização da membrana) e inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-sensíveis, levando à inibição da liberação do transmissor (Rang et al., 1997).

O GABA exerce este tipo de efeito inibitório nas terminações nervosas pré-sinápticas em muitos locais no cérebro e no sistema nervoso periférico (por exemplo, terminações que liberam dopamina no striatum e terminações simpáticas periféricas) (Kamata, 1987; Rang et al., 1997).

A clonagem dos receptores $GABA_A$ (Lüddens et al., 1991; Doble et al., 1992) demonstrou que, conforme esperado, eles pertencem à classe de canais de íons cujo mecanismo de portão é controlado pelo ligante, similar, na sua arquitetura geral, aos receptores nicotínicos da acetilcolina (ACh) e aos receptores ionotrópicos do glutamato. Eles também mostram complexidade molecular similar na forma de subunidades múltiplas, diferencialmente expressas em diferentes regiões cerebrais e conferindo diferentes propriedades farmacológicas (Burt et al., 1991; Lüddens et al., 1991).

Por volta de 1970, a história dos receptores GABA ($GABA_A$) entrelaça-se com a dos receptores benzodiazepínicos. Embora as propriedades ansiolíticas dos BDZ tenham sido descobertas em 1950, o seu mecanismo de ação não foi compreendido ainda por vários anos. No final de 1970, torna-se claro que existiam sítios de ligação específicos no cérebro para os BDZ, apontando assim para a ocorrência de receptores BDZ. Evidências concretas de relações bioquímicas entre os receptores $GABA_A$ e BDZ foram encontradas por Tallman e Gallagher (apud Cooper et al., 1996).

No final de 1980, um grande grupo de pesquisa liderado por Eric Barnard (apud Cooper et al., 1996), relatou a expressão seqüencial e funcional dos genes que codificavam duas subunidades do receptor GABA_A e demonstraram que estas duas subunidades podiam formar um canal de cloreto funcional.

Dois anos mais tarde, outro grupo liderado por Peter Seeberg (apud Cooper et al., 1996) identificava uma condição adicional do receptor, capaz de formar canais de cloro BDZ-sensíveis, provando assim, que os receptores GABA_A e BDZ faziam parte do mesmo complexo. Reconhece-se atualmente que os BDZ aumentam a freqüência da abertura do canal, sem alterar apreciavelmente a condutância e a duração desta abertura. Os barbitúricos, ao contrário, diminuem ligeiramente a freqüência de abertura e prolongam a sua duração. O receptor GABA_A pode ser alterado funcionalmente por uma grande variedade de compostos, que ligam-se ao receptor em diversos sítios distintos, incluindo o sítio GABA, o sítio barbitúrico/picrotoxina (ao contrário da bicuculina, a picrotoxina atua como um antagonista não-competitivo, presumivelmente devido a sua habilidade em bloquear os ionóforos GABA-ativados), o sítio BDZ e o sítio esteróide (Cooper et al., 1996). A ativação e modulação do fluxo de cloro pelo GABA e BDZ são realizadas através de alterações dinâmicas na configuração do complexo protéico. As drogas que ligam-se ao sítio BDZ e aumentam os efeitos eletrofisiológicos do GABA, são denominadas agonistas BDZ, enquanto que compostos que fixam-se ao mesmo sítio e reduzem os efeitos do GABA são nomeados agonistas inversos (Rang et al., 1997).

Modificações discretas na estrutura química de agonistas e agonistas inversos dos BDZ, têm produzido um pequeno número de antagonistas, sendo o mais importante deles o flumazenil ou RO15-1788 (File et al., 1986; June et al., 1994; Pokk et al., 1995; Cooper et al., 1996; Pokk et al., 1997). Esta substância tem muito pouco, ou nenhum, efeito farmacológico quando administrada isoladamente; contudo, ela reverte prontamente todos os efeitos dos agonistas e agonistas inversos BDZ e tem provado ser uma excelente ferramenta nos ensaios experimentais (Cooper et al., 1996).

A compreensão atual da estrutura molecular do complexo receptor GABA_A acredita-se ser representada por uma glicoproteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kD, composta de uma combinação de múltiplos polipeptídios que formam várias subunidades. Cinco classes de distintos polipeptídios geram as subunidades α , β , γ , δ e ρ , que tem sido clonadas e parecem existir múltiplas isoformas de cada uma, de maneira que, é sugerido um número total de 15 subunidades identificadas até agora. A existência de uma família de pelo menos 15 genes que codificam as diversas subunidades (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} , δ , ρ_{1-2}) produzem a base para a extraordinária diversidade estrutural dos receptores GABA_A. A composição das subunidades do receptor GABA_A parece variar de uma região cerebral para outra e também entre neurônios de uma mesma região, porém a exata composição da maioria é desconhecida (Cooper et al., 1996).

A distribuição do RNAm no SNC, determinada pela hibridização *in situ* é muito diferente para cada subunidade. É digno de nota, que a recentemente clonada α -subunidade (α_6), a qual confere, do ponto de vista farmacológico, uma única recombinação na expressão do receptor GABA_A, é somente expressada num único tipo de neurônio, no cerebelo. Portanto, torna-se claro agora, que a heterogeneidade das isoformas das subunidades do receptor GABA_A, parecem conferir uma diversidade de respostas farmacológicas, e talvez fisiológicas, características. Por exemplo, é bem conhecido que a co-expressão de uma γ -subunidade adicional é necessária para que ocorra a potencialização da resposta do GABA pelos BDZ.

Adicionalmente, sabe-se que a co-expressão de variantes individuais de γ -subunidades (γ_1 , γ_2 ou γ_3) com α - e β -subunidades resultam em diferentes graus de modulação realizados pelos ligantes do receptor BDZ (agonista, antagonista e agonista inverso). Estudos de classificação de fotoafinidade tem sugerido que o sítio de ligação dos BDZ reside na subunidade α , enquanto que o sítio de ligação do GABA situa-se na subunidade β (Cooper et al., 1996).

Finalmente, parece que a subunidade α de maneira heterogênea, determina uma diversidade de respostas fisiológicas e farmacológicas nos receptores GABA_A, embora a expressão de subunidades γ seja essencial nas ações modulatórias dos BDZ. Assim, quando co-expresso com a subunidade β_1 , a subunidade α_1 produz um receptor com relativa alta afinidade pelo GABA. Pelo contrário, a co-expressão de α_2 ou α_3 com β_1 resulta num receptor GABA_A, com baixa afinidade pelo GABA.

Estas diferenças sutis na organização das subunidades, podem resultar em subpopulações de receptores GABA_A, que possuem localizações regionais e celulares distintas, cada qual com uma sensibilidade divergente ao GABA. Esta extraordinária heterogeneidade dos receptores GABA_A, claramente fornecem até agora, uma inexplorada diversidade na função dos subtipos desses receptores, afetando a sensibilidade ao GABA, a modulação pelos efetores alostéricos, a adaptação das condições à estímulos, a distribuição no interior dos neurônios e entre eles, o desenvolvimento ontogênico e as alterações nos estados patológicos (Cooper et al., 1996).

A melhor compreensão do complexo receptor GABA/BDZ já resultou no desenvolvimento de seletivos agentes ansiolíticos e anticonvulsivos, que não possuem ações significativamente sedativas e de relaxamento muscular, propriedades que muitas vezes, limitam a utilidade de agentes tradicionais como os BDZ e os barbitúricos (Cooper et al., 1996).

Um bom entendimento das características moleculares e da regulação dos múltiplos sítios alostéricos deste complexo supramolecular e das substâncias endógenas que podem servir-se destes sítios, podem não só contribuir para nossa compreensão das possíveis etiologias das desordens relacionadas à ansiedade e as convulsões, mas também auxiliar no desenvolvimento de agentes terapêuticos mais efetivos e de maior especificidade (Cooper et al., 1996).

O receptor GABA_B, como mencionado acima, está presente em menores níveis no SNC do que o receptor GABA_A e não está ligado a um canal de cloreto. Desde sua descoberta em 1980, muitos progressos tem sido alcançados relativos à farmacologia.

Agonistas seletivos e antagonistas tem sido desenvolvidos e o papel funcional deste receptor, como um mediador potencial de atividade inibitória vagarosa pós-sináptica em várias regiões cerebrais tem emergido. A ativação do receptor GABA_B também realiza um papel na atenuação da liberação de aminas, aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos e hormônios, bem como do GABA, via uma interação com autorreceptores (Cooper et al., 1996).

Enquanto os receptores GABA_A são diretamente associados com canal de Cl⁻, os receptores GABA_B parecem ser acoplados à canais de Ca²⁺ ou K⁺, via um sistema de segundos mensageiros. A ação inibitória do receptor GABA_B ativado, parece ser mediada ou por um aumento na condutância do potássio ou por uma diminuição na condutância do cálcio. Este receptor pode ser distinguido farmacologicamente do receptor GABA_A, por sua seletiva afinidade com o agonista baclofen e por sua falta de afinidade pelo muscimol e bicuculina. Acredita-se que o receptor GABA_B está ligado por proteínas GTP-sensíveis ao canal de cálcio. A ativação do receptor GABA_B pré-sináptico pelo baclofen, diminui a condutância do cálcio e a liberação do transmissor. Já o receptor GABA_B pós-sináptico é indiretamente acoplado à canais de K⁺, via proteína G e medeiam um potencial pós-sináptico tardio (IPSPs). Diferentemente do receptor GABA_A, o receptor GABA_B não é modulado pelos BDZ ou barbitúricos. Estudos farmacológicos tem demonstrado que bloqueando-se receptores GABA_B, não resulta em profundas seqüelas comportamentais, observadas após a administração de antagonistas de GABA_A (e.g. convulsões).

Estes achados sugerem que, ao contrário dos receptores GABA_A, os quais acredita-se estarem em contínuo estado de ativação tônica, os receptores GABA_B, são somente ativados mediante certas condições fisiológicas (Cooper et al., 1996).

Estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado claramente, que bloqueando-se os receptores GABA_B com um potente antagonista, recentemente descoberto (CGP54626), há um aumento na liberação de neurotransmissores (GABA e glutamato), uma diminuição do IPSPs na área CA₁ em neurônios piramidais hipocampais e a condução de uma elevação na excitabilidade neuronal. Estudos comportamentais em diversas espécies, tem sugerido que o bloqueio de receptores GABA_B, pode melhorar a cognição em ratos (aprendizado social), em camundongos (esquivança passiva) e em macacos (teste de cor do espaço condicional) (Cooper et al., 1996).

DROGAS QUE AFETAM A TRANSMISSÃO MEDIADA POR GABA.

Como já foi mencionado, vários agonistas seletivos para os receptores GABA_A e GABA_B são conhecidos, sendo os principais exemplos o muscimol (GABA_A seletivo) e o baclofen (GABA_B seletivo). Existem antagonistas seletivos, tanto para receptores GABA_A (por exemplo, bicuculina), quanto para receptores GABA_B (por exemplo, faclofen). Esses agentes são muito úteis nos estudos experimentais, porém não são utilizados terapeuticamente (Rang et al., 1997).

Uma relação notável existe entre os receptores GABA_A e as ações do grupo de drogas benzodiazepínicas, que possuem poderosos efeitos sedativos e ansiolíticos (ver anteriormente).

Essas drogas potencializam seletivamente os efeitos do GABA nos receptores GABA_A, e existem evidências de que se ligam com elevada afinidade a um local acessório no receptor GABA_A, de modo que a ligação do GABA é facilitada e sua atividade farmacológica é aumentada. É interessante que os receptores GABA_A ocorrem em uma variedade dos neurônios periféricos (por exemplo, células ganglionares autonômicas) onde o GABA não tem papel transmissor; nestes locais, contudo, não existe efeito potencializador dos benzodiazepínicos (Rang et al., 1997).

Determinados barbitúricos também potencializam os efeitos dos GABA_A, porém são muito menos seletivos do que os benzodiazepínicos, e a relevância deste fenômeno nas suas ações depressoras globais sobre o sistema nervoso é incerta (Rang et al., 1997).

Os estudos de reconstituição com receptores GABA_A clonados mostram que a sensibilidade aos benzodiazepínicos depende criticamente de uma das cinco subunidades do receptor. Foi descoberto recentemente (Korpi et al., 1993) que um rato mutante particularmente susceptível aos efeitos comportamentais dos benzodiazepínicos tem um ponto de mutação isolado nesta subunidade particular.

Cooper et al., em 1996, classifica adicionalmente os agonistas GABA (além da classificação baseada na habilidade em penetrar na barreira hemato-encefálica – ver anteriormente) naqueles compostos que estimulam o receptor GABA diretamente ou naqueles que indiretamente causam uma ativação destes receptores, por diversos mecanismos distintos.

Por exemplo, agentes como o muscimol, isoguvacina e THIP são verdadeiras drogas miméticas do GABA, que interagem diretamente nos receptores GABA, sendo que outros compostos, atuando indiretamente, facilitam a transmissão GABAérgica, através do aumento da quantidade de GABA endógeno ou pela alteração, de alguma maneira, no acoplamento do receptor GABA, mediado por uma mudança na permeabilidade ao cloro. Assim, diversos fármacos, muitas vezes classificados como agonistas indiretos, atuam pré-sinápticamente modificando a liberação e o metabolismo do GABA, preferencialmente do que pela interação direta com os receptores GABA. Por essa razão, drogas como a gabaculina (um inibidor de GABA-T), o ácido nipecótico (um inibidor da captação do GABA) e o baclofen são muitas vezes classificados incorretamente como agonistas do GABA (Cooper et al., 1996).

Um amplo número do reconhecimento de sítios associados com os receptores GABA_A tem conduzido à especulação de que existem fatores regulatórios endógenos. Diversos candidatos tem sido identificados, porém com a exceção dos neuroesteróides e do inibidor de ligação do diazepam [(DBI) um peptídeo endógeno], existem pequenas e controversas evidências de que realizem um papel importante na modulação funcional do receptor GABA_A *in vivo*.

Várias evidências sugerem que o DBI funciona como um precursor da família de peptídeos modulatórios alostéricos do receptor GABA_A, causando uma modulação negativa no fluxo do Cl⁻. Consistente com esta ação, o DBI parece ter propriedades ansiogênicas similares àquelas associadas com os agonistas inversos BDZ, em experimentação animal.

Um peptídeo endógeno semelhante, tem sido encontrado no cérebro e fluido cerebrospinal humanos, e já foi notado que a quantidade de DBI imunorreativo é elevada no fluido cerebrospinal de pacientes severamente deprimidos (Cooper et al., 1996).

Outros postulados ligantes endógenos do receptor GABA_A, incluem dois metabólitos esteróides, oriundos da deoxicorticosterona e da progesterona (respectivamente, alotetrahydro-DOC e alopregnanolona) que ocorrem naturalmente. Estes neuroesteróides são formados no cérebro e ligam-se com alta afinidade aos receptores GABA_A, gerando efeitos semelhantes aos dos barbitúricos, que potencializam a condutância do Cl⁻. Eles estão dentre os mais potentes ligantes endógenos conhecidos do receptor GABA_A, encontrados no SNC. Seus níveis plasmáticos e cerebrais (córtex e hipotálamo) são dramaticamente aumentados em ratos expostos ao estresse. A observação de que os níveis séricos e cerebrais da alopregnanolona e alotetrahydro-DOC aumentam rapidamente após o estresse (4-20 vezes em menos de 5 minutos) sugere que estes neuroesteróides podem desempenhar um papel fisiológico no estresse e na ansiedade. Além disso, condições que podem conduzir à uma ampla elevação nos níveis destes esteróides neuroativos, como a puberdade, gravidez ou o ciclo menstrual, podem também alterar as adaptações neuroquímicas e comportamentais durante o estresse (Cooper et al., 1996).

BENZODIAZEPÍNICOS (BDZ).

O primeiro composto do grupo dos benzodiazepínicos, o clordiazepóxido, foi sintetizado por acidente em 1961, com o anel incomum de 7 átomos, tendo sido produzido como resultado de uma reação não-planejada nos laboratórios de Hoffman la Roche (Rang et al., 1997).

A estrutura básica de todos os benzodiazepínicos consiste em um anel incomum de 7 átomos que se une a um anel aromático, com quatro grupos principais substituídos que podem ser modificados sem perda de atividade. Milhares de compostos foram produzidos e testados, e cerca de 20 estão disponíveis para uso clínico. Eles são basicamente semelhantes em suas ações farmacológicas, porém já foi relatado certo grau de seletividade. Por exemplo, acredita-se que alguns compostos exibam uma maior atividade anticonvulsivante que outros em relação aos seus efeitos sedativos e ansiolíticos (Rang et al., 1997). Entretanto, os resultados de diferentes laboratórios mostram amplas variações, provavelmente por causa das variações na metodologia experimental [o ED₅₀ para diazepam nos camundongos, medido por um teste de laboratório padronizado para coordenação motora ("rotarod"), variou entre 2.1 e 30 mg/kg em sete laboratórios diferentes] (Haefely et al., 1981).

Recentemente, foram descobertos medicamentos com uma estrutura semelhante que antagonizam especificamente os efeitos dos benzodiazepínicos, como, por exemplo, o flumazenil (Rang et al., 1997).

Ainda de acordo com Rang et al. (1997), os efeitos mais importantes dos benzodiazepínicos são exercidos sobre o sistema nervoso central e consistem em:

- Redução da ansiedade e da agressão,
- Sedação e indução do sono,
- Redução do tônus muscular e da coordenação e
- Efeito anticonvulsivante.

Os efeitos ansiolíticos em animais e no homem já foi mencionado anteriormente. Os benzodiazepínicos mostram atividade nesse tipo de ensaio e exercem também um acentuado efeito de "domesticação", permitindo que os animais sejam manipulados muito mais facilmente. Com a possível exceção de alprazolam, os benzodiazepínicos não exercem efeitos antidepressivos específicos, apesar de o alívio da ansiedade poder ser benéfico nos pacientes deprimidos. Paradoxalmente, os benzodiazepínicos podem produzir um aumento na irritabilidade e na agressão em alguns indivíduos.

Isso parece ser particularmente pronunciado com o fármaco de ação ultracurta triazolam (e resultou em sua retirada no Reino Unido e em alguns outros países), sendo em geral mais comum com alguns compostos de ação curta (Rang et al., 1997).

Os benzodiazepínicos reduzem o tempo transcorrido até adormecer e aumentam a duração total do sono, porém o último efeito ocorre apenas nos indivíduos que normalmente dormem cerca de menos de seis horas a cada noite. Ambos os efeitos tendem a declinar quando os benzodiazepínicos são administrados regularmente por uma a duas semanas (Rang et al., 1997).

Em geral, os efeitos sedativos dos benzodiazepínicos parecem andar de mãos dadas com seus efeitos ansiolíticos, razão pela qual ainda não foi possível elaborar um fármaco ansiolítico não-sedativo dessa classe (Rang et al., 1997).

Os benzodiazepínicos parecem reduzir o tônus muscular por uma ação central que independe de seu efeito sedativo. Os gatos são particularmente sensíveis a essa ação, e alguns benzodiazepínicos (por exemplo, clonazepam, flunitrazepam) reduzem a rigidez de descerebração em doses muito menores que aquelas necessárias para produzir efeitos comportamentais. Em outras espécies, o efeito é menos claro (Rang et al., 1997).

A coordenação pode ser testada medindo-se o período de tempo durante o qual os camundongos conseguem permanecer sobre uma haste plástica horizontal em rotação lenta, ou o tempo transcorrido para que possam escapar do confinamento escalando o interior de uma chaminé tubular. O aumento do tônus muscular constitui uma característica comum dos estados de ansiedade no homem e pode contribuir para os incômodos e as dores, incluindo cefaléia, que costumam atormentar os pacientes ansiosos. O efeito relaxante dos benzodiazepínicos pode, portanto, ser clinicamente útil. Uma redução no tônus muscular parece possível sem produzir incoordenação apreciável (Rang et al., 1997).

Originalmente, admitia-se que os benzodiazepínicos, na falta de evidência em contrário, agiam como "depressores inespecíficos". Entretanto, em 1977, constatou-se que os benzodiazepínicos interagem com locais específicos de ligação no cérebro.

A ligação a outros tecidos além do cérebro é fraca ou nula e, dentro do cérebro, a ligação do diazepam mostra uma distribuição regional distinta. A ligação é mais elevada no córtex cerebral, menor no sistema límbico e no mesencéfalo e ainda menor no tronco cerebral e na medula espinhal. Há um consenso aproximado, porém não exato, com a contagem dos receptores GABA_A, embora o número de locais para os benzodiazepínicos seja sistematicamente menor. A correlação entre as afinidades para os locais de ligação e a potência farmacológica entre uma ampla gama de benzodiazepínicos é razoável, mas não perfeita (Braestrup et al., 1986).

As discrepâncias são até 10 vezes maiores para alguns compostos. Isto pode ser devido, em parte, ao fato de que as mensurações farmacológicas foram feitas *in vivo*, razão pela qual os medicamentos estiveram sujeitos a alterações metabólicas. Sabe-se que os benzodiazepínicos são metabolizados com ritmos extremamente variáveis e que, em alguns casos, os metabólitos são farmacologicamente ativos. Como alternativa, a heterogeneidade entre os locais de ligação pode obscurecer uma correlação simples da ligação global com a atividade (Rang et al., 1997).

Aproximadamente desde a mesma época em que se descobriu a existência de ligação específica dos benzodiazepínicos há acúmulo de evidências de que esses medicamentos aumentam especificamente as ações do GABA. Os estudos sobre ligação revelaram algo do mecanismo dessa interessante interação. Existe um aumento mútuo da ligação entre GABA e benzodiazepínicos.

Os dois fármacos fixam-se em locais independentes sobre o mesmo complexo receptor-canal iônico, e cada um deles aumenta a afinidade dos locais pelo outro, sem afetar o número total de locais (Rang et al., 1997).

Os benzodiazepínicos, por si sós, não abrem os canais do cloreto, mas agem alostericamente aumentando as afinidades dos receptores para o GABA (Rabow et al., 1995; Sieghart, 1995; Rang et al., 1997).

A clonagem do receptor GABA_A (Lüddens et al., 1991; Doble et al., 1992) forneceu algumas perspectivas acerca da interação molecular entre a fixação dos benzodiazepínicos e a ação do GABA, porém os detalhes são complexos e ainda longe de serem claros. Cada uma das principais subunidades (α , β , γ , δ) existe em vários subtipos; por exemplo, foram definidos seis subtipos α diferentes e quatro subtipos β diferentes. A expressão controlada de diferentes combinações das subunidades receptoras em oócitos do sapo permitiu que as funções de cada uma delas fossem compreendidas mais claramente. “Receptores” que consistem apenas em um único tipo de subunidade (α , β ou γ) são capazes de responder ao GABA, razão pela qual parece que todas essas subunidades possuem locais de ligação de GABA (Rang et al., 1997).

Entretanto, a função ótima depende da presença de todos os três subtipos. A subunidade α é essencial para a modulação por parte dos benzodiazepínicos, e acredita-se que contém o local de fixação dos benzodiazepínicos. Uma variante da subunidade α (α_6) não possui esse local, e os receptores que contém essas subunidades, e que estão presentes em várias regiões cerebrais, são insensíveis aos benzodiazepínicos.

Outras variantes dessa subunidade podem dar origem a dois tipos distintos de receptor benzodiazepínico (BZ₁ e BZ₂) que diferem em suas propriedades farmacológicas e distribuição dentro do cérebro (Doble et al., 1992). A subunidade γ também deve estar presente para que os benzodiazepínicos possam agir, e suas variantes afetam a seletividade para diferentes ligantes dos benzodiazepínicos (Rang et al., 1997).

O receptor GABA_A é responsivo a uma gama extraordinariamente ampla de moduladores químicos (Sieghart, 1992), incluindo vários depressores do SNC, tais como barbitúricos, etanol e esteróides anestésicos, e essas interações podem ser responsáveis pelos efeitos de muitos desses medicamentos sobre a função cerebral.

A existência de receptores benzodiazepínicos específicos sugeriu que poderia haver um ligante endógeno (análogo às endorfinas em relação ao receptor da morfina) cuja função consistisse em regular o efeito inibitório do GABA. Ainda não foi identificada de maneira definitiva uma substância desse tipo, porém já houve muita especulação (Barbaccia et al., 1988).

Um candidato, que agora sabemos tratar-se de um artefato, era o etil β -carbolina 3-carboxilato (β -CCE). Outro candidato é o peptídeo de 10 kDa, o inibidor da ligação do diazepam (DBI), isolado do cérebro do rato. Este peptídeo liga-se fortemente ao local de ligação dos benzodiazepínicos do receptor GABA_A, porém e como o β -CCE, exerce o efeito oposto aos benzodiazepínicos; isto é, esses compostos inibem a abertura dos canais de cloreto pelo GABA e exercem um efeito ansiogênico e pró-convulsivante (Rang et al., 1997).

O termo “agonista inverso” é aplicado aos medicamentos que se unem aos receptores benzodiazepínicos e exercem o efeito oposto daquele dos benzodiazepínicos convencionais, produzindo sinais de maior ansiedade e convulsões. O β -CCE constitui um exemplo (Rang et al., 1997).

Poderá ser possível explicar essas complexidades em termos do modelo de dois estados, postulando que o receptor benzodiazepínico existe em duas conformações distintas, com apenas uma delas (A) podendo ligar-se a uma molécula GABA e abrir o canal de cloreto. A outra conformação (B) não pode ligar-se ao GABA. Normalmente, sem a presença de um ligante dos receptores benzodiazepínicos, existe equilíbrio entre essas duas conformações; a sensibilidade ao GABA está presente, porém é submáxima. Admite-se que os agonistas benzodiazepínicos (por exemplo, diazepam) fixam-se somente na conformação A, desviando dessa forma o equilíbrio em favor de A e aumentando a sensibilidade ao GABA. Os agonistas inversos ligam-se seletivamente ao B e exercem o efeito oposto. Os antagonistas competitivos, tais como o flumazenil, ligam-se igualmente ao A e B e, conseqüentemente, não perturbam o equilíbrio conformacional, mas, por outro lado, impedem a ligação de outras substâncias ao receptor benzodiazepínico, antagonizando dessa forma o efeito tanto dos agonistas simples quanto dos agonistas inversos (Rang et al., 1997).

Os benzodiazepínicos são bem absorvidos quando administrados por via oral, produzindo habitualmente a concentração plasmática máxima em cerca de uma hora. Alguns deles (por exemplo, oxazepam, lorazepam) são absorvidos mais lentamente.

Ligam-se firmemente às proteínas plasmáticas, porém sua alta solubilidade lipídica faz com que muitos deles se acumulem gradualmente na gordura corporal. Esses dois fatores resultam em volumes de distribuição não muito diferentes de 1l/kg de peso corporal para a maioria dos benzodiazepínicos. Eles são todos inativados por processos metabólicos e acabam sendo excretados como conjugados de glicuronídeo na urina (Rang et al., 1997).

Variam grandemente quanto à sua duração de ação e podem ser divididos, a grosso modo, em compostos de ação rápida, média e prolongada (Rang et al., 1997).

A distinção entre essas categorias depende, em parte, de o medicamento formar ou não um metabólito de ação prolongada e farmacologicamente ativo, como N-desmetildiazepam (nordiazepam). A meia-vida deste composto, que é encontrado na via metabólica de vários dos benzodiazepínicos, é de aproximadamente 60 horas, sendo responsável pela tendência de muitos benzodiazepínicos em produzir efeitos cumulativos e longas ressacas quando são administrados a intervalos regulares. Os compostos de ação rápida são aqueles metabolizados diretamente por conjugação com o glicuronídeo (Rang et al., 1997).

Os efeitos indesejados dos benzodiazepínicos podem ser divididos em (Rang et al., 1997):

Efeitos tóxicos que resultam da superdosagem aguda,

Efeitos indesejados que ocorrem durante a administração terapêutica normal e

Tolerância e dependência.

Os benzodiazepínicos em superdose aguda são consideravelmente menos perigosos que os outros fármacos ansiolíticos/hipnóticos. Levando-se em conta que, com demasiada frequência, essas drogas são usadas em tentativas de suicídio, essa propriedade constitui uma vantagem importante.

O efeito de uma superdose consiste em causar sono prolongado, podendo o paciente normalmente ser acordado, sem que se observe depressão séria da respiração ou da função cardiovascular. Entretanto, na presença de outros depressores do SNC, particularmente o álcool, os benzodiazepínicos podem causar depressão respiratória grave, capaz de ameaçar a vida. A disponibilidade de um antagonista efetivo, o flumazenil, significa que os efeitos de uma superdose aguda podem ser neutralizados, o que não é possível com a maioria dos depressores do SNC (Korkmaz et al., 1995; Rang et al., 1997).

Os principais efeitos colaterais dos benzodiazepínicos são sonolência, confusão, amnésia e menor coordenação motora, o que afeta consideravelmente as habilidades manuais, como ocorre com o desempenho de um motorista. Os benzodiazepínicos parecem possuir essencialmente a mesma tendência em produzir dependência, como ocorre com outros hipnóticos do tipo dos barbitúricos, porém são menos propensos a produzir tolerância (Rang et al., 1997).

A tolerância possui dois componentes. A tolerância farmacocinética (isto é, a produção de uma concentração sanguínea mais baixa com a utilização prolongada) não é importante para os benzodiazepínicos, pois eles exercem pouco efeito indutor sobre as enzimas microssomais hepáticas.

Entretanto, produzem certo grau de tolerância tecidual; esta parece ser semelhante em grau àquela que ocorre com os barbitúricos, porém são poucas as mensurações objetivas. O efeito indutor do sono mostra relativamente pouca tolerância (Rang et al., 1997).

Lader (1983) constatou que, nos indivíduos normais, a euforia associada com uma injeção intravenosa de diazepam desaparecia naqueles que tomavam diariamente diazepam oral, o mesmo ocorrendo com a oscilação na liberação do hormônio do crescimento. Não ficou claro se a tolerância ao efeito ansiolítico é significativa.

As alegações iniciais de que os benzodiazepínicos não podiam produzir dependência foram reconhecidas agora como falsas (Lader, 1983; Woods et al., 1987).

Em indivíduos sadios e nos pacientes, a interrupção no tratamento com benzodiazepínicos após semanas ou meses acarreta um aumento nos sintomas de ansiedade, juntamente com o aparecimento de tremores e vertigens (Marks, 1978). Em animais experimentais, a abstinência produz sinais incontestáveis de dependência física, ou seja, nervosismo, tremores, perda de apetite e, ocasionalmente, convulsões, porém os animais mostram apenas fraca tendência para auto-administração dos benzodiazepínicos. A síndrome de abstinência, tanto em animais quanto no homem, em geral é de início mais lento e menos intensa que aquela observada com os barbitúricos, provavelmente por causa da meia-vida plasmática longa da maioria dos benzodiazepínicos. Os benzodiazepínicos de ação mais curta causam efeitos de abstinência mais bruscos.

Com o triazolam, que é um medicamento de ação extremamente curta, o efeito de abstinência torna-se evidente dentro de poucas horas, até mesmo após uma única dose, resultando em insônia durante o início da madrugada, assim como em relatos de ansiedade diurna quando o medicamento é utilizado como hipnótico (Rang et al., 1997).

Os antagonistas competitivos dos benzodiazepínicos foram descobertos em 1981. O composto mais bem conhecido é o flumazenil. Foi relatado originalmente que este composto carece de efeitos sobre o comportamento ou sobre as convulsões induzidas por medicamentos quando administrado isoladamente, porém constatou-se, a seguir, que possui alguma atividade “ansiogênica” e pró-convulsivante [de acordo com Pokk et al., (1997), o flumazenil em altas doses exerce efeitos ansiogênicos].

Segundo Broaden et al. (1988), o flumazenil foi introduzido para uso clínico, principalmente para reverter a ação sedativa dos benzodiazepínicos usados durante a anestesia, e também no tratamento da superdose aguda de benzodiazepínicos. O flumazenil age rápida e eficazmente quando injetado, daí sua ação durar apenas cerca de duas horas, razão pela qual a sonolência tende a retornar. As convulsões podem ocorrer raramente nos pacientes tratados com flumazenil, e isto parece ser mais comum nos pacientes que estão recebendo antidepressores tricíclicos.

Foi relatado recentemente que o flumazenil é eficaz em duas situações inesperadas, ou seja, para neutralizar a sonolência e o coma associados com doença hepática grave (encefalopatia hepática) e na intoxicação alcoólica (Rang et al., 1997).

A pesquisa acerca dos efeitos neuroquímicos dos benzodiazepínicos chamou a atenção para o papel de outros sistemas neurotransmissores passíveis de ser controlados pelas vias GABA, através das quais a manipulação da transmissão GABA pode resultar em efeitos comportamentais. Em relação ao controle da ansiedade e da agressão, existe considerável evidência indicativa de algum papel para a 5-HT (Kahn et al., 1988; Blackburn, 1992). Assim sendo, os benzodiazepínicos inibem o acionamento dos neurônios 5-HT nos núcleos da rafe, e a destruição química dos neurônios 5-HT em regiões específicas dos núcleos da rafe é responsável pela eliminação do tipo de supressão comportamental que é usada como modelo para a ansiedade. Entretanto, os estudos comportamentais, baseados no modelo de ansiedade em animais e em observações clínicas no homem, com medicamentos que afetam a 5-HT, incluindo vários agonistas, os inibidores da síntese, os antagonistas e os bloqueadores da captação, produziram resultados duvidosos, razão pela qual não parece existir uma base concreta para tentar elaborar fármacos ansiolíticos com apoio neste princípio (Rang et al., 1997). Contudo, a poderosa atividade ansiolítica da buspirona, que agora vem sendo utilizada clinicamente, fez renascer o interesse pelo papel da 5-HT. A buspirona possui alta afinidade pelos receptores 5-HT_{1A} que são abundantes em certas regiões do cérebro (por exemplo, a região do septo do hipocampo) que recebem uma projeção proveniente dos neurônios 5-HT da rafe do mesencéfalo (Rodgers et al., 1997c).

Fixa-se também aos receptores da dopamina, porém é provável que suas ações relacionadas com 5-HT sejam importantes para a supressão da ansiedade, pois os compostos ansiolíticos correlatos, como por exemplo, ipsapirona e gepirona mostram uma alta especificidade pelos receptores 5-HT_{1A} (Traber et al., 1987). Ainda não foi esclarecido como funcionam exatamente esses agentes ansiolíticos da 5-HT (Lucki, 1992).

Eles são agonistas no nível dos receptores 5-HT_{1A} e, assim sendo, poderiam ser considerados como capazes de reproduzir a hiperatividade dos neurônios 5-HT, enquanto a ação dos benzodiazepínicos resulta em inibição desses neurônios. É possível que estejam agindo sobre os receptores pré-sinápticos inibitórios, reduzindo dessa forma, a liberação de 5-HT. Entretanto, levam dias ou semanas para produzir seus efeitos no homem, sugerindo um mecanismo indireto mais complexo para sua ação. A buspirona, ipsapirona e gepirona exercem efeitos colaterais bastante diferentes daqueles dos benzodiazepínicos. Não causam sedação nem incoodenação motora, e também não foram relatados efeitos de abstinência. Seus principais efeitos colaterais são náuseas, vertigens, cefaléia e agitação, que em geral parecem ser menos incômodos que os efeitos colaterais dos benzodiazepínicos (Rang et al., 1997).

Está bem conhecido o fato de que o GABA co-existe com transmissores clássicos como a 5-HT, DA, Ach, glicina e histamina, bem como com um grande número de peptídios incluindo CCK, NPY, VIP, substância P e muitos outros. Atualmente a função de tais moléculas que co-existem com o GABA, especialmente os peptídios, é muitas vezes difícil de avaliar no SNC (Cooper et al., 1996).

COMPORTAMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO NOS MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE, ESPECIALMENTE NO “LEC”.

Estudos realizados no laboratório do Dr. John Rodgers, na Universidade de Leeds (UK), confirmaram que os agonistas (total e parcial) do receptor benzodiazepínico, produzem mudanças comportamentais no “LEC”, consistentes com uma redução na ansiedade (Cole et al., 1993 e 1995b; Johnson et al., 1996).

Tipicamente, estes agentes reduzem as mensurações relacionadas ao ato de esquivar-se dos braços abertos e da “avaliação de risco” (e.g., “SAP”), enquanto aumentam o comportamento exploratório “head-dipping”. Tais mudanças geralmente ocorrem com doses que não suprimem a atividade geral, e aparentemente são sucedidas, tanto a um tratamento agudo (Cole et al., 1993 e 1995b; Johnson et al., 1996) quanto a um crônico (Rodgers et al., 1997c).

Entretanto, enquanto altas doses de clordiazepóxido e diazepam podem aumentar os registros relacionados à imobilidade, tais mudanças não foram observadas com o agonista parcial bretazenil (Rodgers et al., 1997a).

Esta comparação indica que os métodos atuais, são capazes de discriminar compostos provenientes da mesma classe geral, e que os agonistas parciais realmente podem ser, do ponto de vista comportamental, mais seletivos do que os agonistas totais.

Além disso, como foi informado na época, para o “zero-maze” com ratos (uma variante anular do “LEC” com quadrantes de aberto/fechado alternados; Shepherd et al., 1994) e também para o “LEC” com ratos (Griebel et al., 1996a), as reduções induzidas por benzodiazepínicos na “avaliação de risco”, tendem a acontecer com doses abaixo daquelas requeridas para aumentar significativamente a atividade sobre os braços abertos (Rodgers et al., 1997a).

Este achado sugere que, como para o aumento de “head-dipping”, reduções na “avaliação de risco” podem ser um sinal particularmente sensível relativo a atividade comportamental semelhante a observada com benzodiazepínicos. Finalmente, como vaticinado, a base do controle bidirecional da ansiedade, via complexo protéico receptor benzodiazepínico/GABA_A, para compostos agindo como agonistas inversos, neste sítio (e.g., FG 7142), produzem efeitos ansiogênicos no “LEC”, entretanto, de maneira interessante, as alterações na “avaliação de risco” são menos aparentes (efeito máximo?), do que as mudanças relacionadas ao ato de esquivar-se dos braços abertos (Rodgers et al., 1995a).

Embora, se tenha plena convicção de que os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos, professam suas ações comportamentais, através da facilitação da função do receptor GABA_A, os efeitos de manipulações diretas, no sistema GABAérgico em modelos animais de ansiedade, são hoje, altamente variáveis. Contudo, recentes estudos realizados (Dalvi et al., 1996; Rodgers et al., 1996), mostraram que, em contraste com a falta de efeito específico do agonista (R(+))baclofen) e do antagonista (CGP 35348) sobre o receptor GABA_B, outros fármacos podem agir facilitando indiretamente a função do GABA (valproato de sódio) ou estimulando diretamente o receptor GABA_A (muscimol) produzindo um

comportamento seletivo similar ao observado no perfil ansiolítico do diazepam no "LEC" com murídeos. Além disso, antagonistas de GABA_A, como a picrotoxina (Dalvi et al., 1996) e o pentilenotetrazole (Rodgers et al., 1995a), produzem claras evidências de atividade ansiogênica, acompanhada, em altas doses, por supressão comportamental. De modo intrigante, comparativamente baixas doses (2-4 mg/kg) de pentilenotetrazole (vs uma dose ansiogênica de 20 mg/kg) foram associadas com um perfil ansiolítico, um achado que claramente merece pesquisa adicional (Rodgers et al., 1997a).

Como já foi mencionado, estudos bioquímicos e eletrofisiológicos têm demonstrado que os benzodiazepínicos (e.g. diazepam) facilitam a transmissão GABAérgica no sistema nervoso central de mamíferos, via modulação alostérica positiva do complexo receptor GABA_A (Rabow et al., 1995; Sieghart, 1995). Se esta ação neuroquímica é relevante relativamente as propriedades ansiolíticas dos benzodiazepínicos, pode-se prever que os agonistas do receptor GABA_A podem reduzir e que os antagonistas deste receptor, podem aumentar, os índices comportamentais de ansiedade (Dalvi et al., 1996).

Entretanto, manipulações das funções do receptor GABA_A tem produzido alta variabilidade e, muitas vezes, resultados negativos em modelos animais de ansiedade (Sanger, 1985; Shephard, 1986 e 1987), um perfil que não é inconsistente com a possibilidade de que os benzodiazepínicos atenuam a ansiedade, através de outros mecanismos diferentes do que a via receptor GABA_A (Paredes et al., 1992).

A elevação geral dos níveis do GABA, através da inibição da GABA-transaminase (GABA-T), tem sido amplamente reconhecida em gerar reduções na ansiedade, tanto nos modelos animais tradicionais como nos etológicos (Dalvi et al., 1996).

Desta maneira, há relatos de que o ácido valpróico possui efeitos ansiolíticos nos modelos de: teste de conflito (Sanger, 1985; Shephard, 1986 e 1987), em respostas emocionais condicionadas (Cannizzaro et al., 1987), neofóbicos (Shephard et al., 1989), no teste da escada [(“staircase”) Simiand et al., 1984], no campo aberto [(“open-field”) Barros et al., 1992], na interação social (Corbett et al., 1991), na exploração da caixa branca/escuro [(“light/dark”) De Angelis, 1992] e no “LEC” (File et al., 1988; Corbett et al., 1991). Contudo, enquanto outros inibidores de GABA-T (e.g. AOAA e vigabatrin) são também ativos nos testes de interação social e “LEC” (Corbett et al., 1991; Sayin et al., 1992; Sherif et al., 1994a; Sherif et al., 1994b), eles tem geralmente promovido efeitos inespecíficos nos testes baseados em respostas punitivas (Hodges et al., 1981; Rasmussen et al., 1981; Gardner et al., 1982; Hodges et al., 1984; Ágmo et al., 1991; Corbett et al., 1991). Além disso, as reduções nos níveis de GABA produzidas pela isoniazida (um inibidor da síntese de GABA) tem também demonstrado a ocorrência de efeitos não específicos no teste de conflito (Costa et al., 1984; Thiebot et al., 1987; Ágmo et al., 1991), e o envolvimento de mecanismos relacionados ao GABA nos efeitos ansiolíticos induzidos pelo ácido valpróico tem sido seriamente questionados (Sanger, 1985; Shephard, 1986 e 1987).

Não obstante estes achados, deve-se notar que, embora não extensivamente estudados, diversos inibidores da recaptação do GABA tem sido mais recentemente relatados por possuírem efeitos ansiolíticos nos testes punitivos de beberagem (e.g. Giusti et al., 1990; Ágmo et al., 1991).

A literatura acerca dos efeitos comportamentais associados aos ligantes do receptor GABA_A é igualmente bastante variável (Dalvi et al., 1996). Assim, enquanto agonistas do receptor GABA_A (e.g. muscimol, isoguvacine, THIP) são noticiados como destituídos de ações anticonflitantes (Thiebot et al., 1979; Cook et al., 1980; Rasmussen et al., 1981; Gardner et al., 1982; Shephard et al., 1990; Ágmo et al., 1991; Corbett et al., 1991), perfis positivos tem sido observados em recentes estudos empregando modelos etológicos (e.g. Corbett et al., 1991; Nastiti et al., 1991; Rodgers et al., 1997d).

Apesar da bicuculina, um antagonista competitivo do receptor GABA_A, exercer efeitos pró-conflitantes (Corda et al., 1986), ela tem sido mais freqüentemente reportada como tendo efeitos inespecíficos nos modelos animais de ansiedade (Zakusov et al., 1977; Ágmo et al., 1991; Nastiti et al., 1991; Toal et al., 1991). Contrastando com estes achados, a picrotoxina, um antagonista não-competitivo do receptor GABA_A, tem mais consistentemente sido observada aumentando a ansiedade em diversos procedimentos, incluindo a supressão condicionada (Soubrie et al., 1979; Prado de Carvalho et al., 1983; Quintero et al., 1985; Corda et al., 1986; Stutzmann et al., 1987), neofóbicos (Soubrie et al., 1979), não-recompensa frustrante (Soubrie et al., 1979), interação social (File et al., 1984), exploração na caixa clara/escuro (Shimada et al., 1995) e elevado "LEC" (Rodgers et al., 1994a).

A despeito destes dados, tem-se verificado que a picrotoxina apresenta efeitos comportamentais inespecíficos em outros testes de supressão condicionada (Ågmo et al., 1991; Toal et al., 1991), nenhuma ação no teste de vocalização ultrasônica induzido pelo choque (De Vry et al., 1993) e efeitos ansiolíticos no modelo condicionado defensivo de enterrar objetos (Treit, 1987).

O complexo receptor GABA_A sofre rápidas e persistentes mudanças no cérebro de animais estressados (Biggio et al., 1990; Drugan et al., 1993; Drugan et al., 1994) conseqüentemente, os efeitos comportamentais oriundos das drogas que atuam neste complexo receptor, são diferentes em animais estressados quando comparadas aos animais não estressados (Boix et al., 1989). Como regra geral, os agonistas benzodiazepínicos inibem as conseqüências comportamentais advindas da exposição ao estresse, enquanto os agonistas inversos BDZ as aumentam (Conti et al., 1990; Charrier et al., 1995).

Diversos modelos, agudos ou crônicos, de estresse exercem efeitos ansiogênicos nos animais de laboratório. Em ratos e camundongos, o estresse agudo (manipulação, exposição ao barulho, choque na pata, etc.) reduzem a atividade locomotora (Stone et al., 1995; Ferretti et al., 1995) e induzem um efeito ansiogênico no "LEC" (Andrews et al., 1993; McBlane et al., 1994) e no "holeboard" (Ferretti et al., 1995; Armario et al., 1991).

Alguns experimentos tem demonstrado que, ao contrário de outros modelos de estresse, os camundongos expostos previamente ao paradigma de estresse denominado pequena plataforma ("Small platform stress") exibem um comportamento ansiolítico na aplicação do "LEC" (Pokk et al., 1995; Pokk et al., 1996a).

Além disso, a exposição ao estresse na pequena plataforma, induz mudanças na atividade funcional do complexo receptor GABA_A, refletidas por um aumento no número de receptores BDZ corticais e uma redução na captação do GABA pelas microvesículas cerebrais (Pokk et al., 1996b). Estudos comportamentais tem demonstrado uma diminuição na sensibilidade ao efeito ansiolítico e um aumento na sensibilidade ao efeito sedativo do diazepam e do etanol nos animais expostos ao estresse na pequena plataforma (Pokk et al., 1995; Pokk et al., 1996a). Daí o surgimento da hipótese de que o estresse induzido pela pequena plataforma promove mudanças que podem ser responsáveis pela modificação dos efeitos das drogas que atuam no complexo receptor GABA_A (Pokk et al., 1997).

Pokk et al., (1997), estudando o efeito do flumazenil sobre o comportamento de camundongos estressados e não estressados no "LEC", considera que no grupo não-estressado, o flumazenil na dose de 2,0 mg/kg não produziu efeitos, enquanto que a dose de 10,0 mg/kg exerceu uma ação ansiogênica no teste "LEC". Estes resultados estão em concordância com File (1982), que observou efeitos ansiogênicos do flumazenil após a administração de altas doses. Embora o flumazenil tenha sido inicialmente considerado como um antagonista BDZ "neuro", desprovido de uma atividade intrínseca (Crawley et al., 1984), dados mais recentes demonstraram que o efeito do flumazenil é altamente dependente da dose e do nível de ansiedade dos animais de laboratório (File et al., 1986). Em animais com um alto nível de ansiedade, o flumazenil pode produzir um efeito ansiolítico, enquanto em animais com baixo nível de ansiedade, um efeito ansiogênico (File et al., 1989a; Urbancic et al., 1990; Ferre et al., 1994).

Este fato é suportado pela verificação de que efeitos ansiolíticos do flumazenil tem sido observados em seres humanos submetidos a um estresse simulado (Kapezinski et al., 1994).

Segundo Pokk et al. (1997), que observou um efeito ansiogênico do flumazenil, na dose de 2,0 mg/kg em camundongos estressados, no modelo da pequena plataforma e não verificou os mesmos efeitos no grupo não-estressado, existem diversas hipóteses acerca do aumento seletivo da ação do flumazenil. Uma das possíveis explicações refere-se a observação de que um débil efeito ansiogênico do flumazenil em baixas doses, ocorre por conta da ação ansiolítica (atividade protetora do estresse) promovida pelo estresse na pequena plataforma. A elevação da ação do flumazenil pode também ser explicada pela seu efeito como antagonista do receptor BDZ. É possível que o estresse induzido na pequena plataforma, possa aumentar a concentração do ligante benzodiazepínico endógeno (Pokk et al., 1997). A existência de tal ligante foi recentemente proposta (Drugan et al., 1993; Drugan et al., 1994). Assim, o flumazenil pode atuar bloqueando os efeitos deste ligante BDZ endógeno. Outra explanação pode advir da observação em mais um estudo, do aumento da expressão de receptores BDZ nos animais submetidos à pequena plataforma, como uma reação compensatória à redução GABAérgica (Pokk et al., 1996a). O bloqueio dos receptores BDZ pelo flumazenil iria desmascarar a redução GABAérgica e assim, aumentar o nível de ansiedade.

A respeito particularmente das dosagens dos fármacos utilizados na aplicação do "LEC" em camundongos, os autores preconizam atualmente para o agonista GABA_A, o diazepam, posologias agudas que variam de 1 mg/kg i.p. (Cole et al., 1995b; Moreau et al., 1997; Rochford et al., 1997; Rodgers et al., 1998) ou 1.5 mg/kg i.p. (Dalvi et al., 1996; Belzung et al., 1997), ou ainda 2,0 mg/ kg i.p. (Griebel et al., 1998; Shaji et al., 1998), até 8 mg/kg i.p. (Miyazaki et al., 1995) ou para tratamento crônico 2-4 mg/kg/dia/8 dias i.p. (Rodgers et al., 1993a). Pokk et al. (1995) consideram que na dose de 2,5 mg/kg i.p. o diazepam produziu um efeito sedativo, que foi refletido por um decréscimo no número total de ingressos realizados sobre os braços abertos e fechados do "LEC", enquanto Helton et al. (1998) julgaram 0,5 mg/kg p.o. uma dose aguda efetiva.

Já para o antagonista flumazenil indica-se, 2,0 mg/kg i.p. (PoKK et al., 1997), 4,0 mg/kg (Shaji et al., 1998), ao passo que Nogueira et al. (1998) avaliam que as doses de 1,5, 2,0 e 2.5 mg/kg i.p. são todas eficientes. Singh et al. (1998) recomendam 10 mg/kg i.p.

Da Rocha et al. (1997) utilizaram em camundongos submetidos ao teste de natação forçada, 2,0 mg/kg i.p. de diazepam e 16 mg/kg i.p. de flumazenil.

2.6. ANSIEDADE E SUAS INTERAÇÕES COM O SISTEMA OPIÓIDE.

INTRODUÇÃO.

Quase todos os peptídios afetam células-alvo específicas no sistema nervoso central e periférico, incluindo os neurônios, as células da glia e músculo liso glandular e vascular. Até hoje, o censo relativo aos peptídios com desconhecida função já excede uma centena. Porém, sabe-se que as concentrações molares de qualquer peptídio encontrado no cérebro, possui uma magnitude máxima duas à três vezes mais reduzida do que as monoaminas, a acetilcolina (Ach) e os aminoácidos e, que os seus receptores respondem efetivamente à estas baixas concentrações. As vantagens exclusivas associadas aos peptídios ainda não são óbvias. Além disso, com poucas exceções, estas substâncias não foram ainda vinculadas de maneira seletiva à um determinado sistema funcional no cérebro ou correlacionadas de qualquer forma específica com algum estado patológico (Cooper et al., 1996).

Os neurônios que secretam peptídios diferem biologicamente daqueles que utilizam aminoácidos e monoaminas; os transmissores ligados aos aminoácidos ou monoaminas são formados à partir da dieta, por um ou dois passos enzimáticos intracelulares, sendo o produto final representado por uma molécula de transmissor ativo, que freqüentemente é armazenado na terminação nervosa até ser liberado.

Após a sua liberação, o transmissor pode ser re-acumulado nestes locais, através de um processo de recaptação ativo dependente de energia, conservando assim, um requerimento para uma nova síntese. As células que secretam peptídios empregam um approach bem mais formidável: a síntese é dirigida por RNAm, geralmente ocorre somente nos ribossomos e assim, unicamente no pericario ou dendritos de um neurônio. Ademais, todos os peptídios conhecidos originam-se de pró-hormônios (precursores inativos). Desta maneira, os peptídios provêm da síntese ribossomal de pró-hormônios, que em seguida, são acondicionados em vesículas no retículo endoplasmático da musculatura lisa, sendo transportados para o pericario da terminação nervosa, visando eventual liberação (Cooper et al., 1996).

Os neurônios que liberam peptídios compartilham de certas propriedades básicas de todos os outros que já foram caracterizados quimicamente: a liberação do transmissor é cálcio-dependente e alguns dos efeitos pós-sinápticos podem ser mediados por alteração direta na condutância do canal iônico ou por regulação indireta destes canais, através de segundos mensageiros, tais como o Ca^{2+} , nucleotídios cíclicos ou trifosfato de inositol (Cooper et al., 1996).

Além disso, como ocorre com as monoaminas, peptídios idênticos a esses encontrados no sistema nervoso, são freqüentemente produzidos por células secretoras não-neuronais em glândulas endócrinas e na mucosa de algumas vísceras. Algumas características dos neuropeptídios devem ser enfatizadas, como a extrapolação de suas ações hormonais: células-alvo que se encontram distantes dos sítios de liberação, sua liberação em outros sistemas circulatórios, como o porta, alta potência e um tempo mais longo de efeitos.

Embora os hormônios endócrinos (peptídios ou aminas) possam produzir ações em escala nanomolar, não são conhecidas ainda o decurso de tempo ou o limiar dos mesmos neuropeptídios, que atuam em células-alvo no cérebro ou nos gânglios periféricos. Pelo menos um peptídio atua nos gânglios autonômicos de anfíbios, produzindo potenciais sinápticos que perduram por centésimos de milissegundos. Estes efeitos dos peptídios endógenos são muito similares àqueles do hormônio luteinizante hipotalâmico e são produzidos sobre um alvo neuronal não-sináptico através da difusão de no mínimo 10-100 μm , provenientes de sítios de liberação sináptica pré-ganglionar, sem atuar aparentemente em todo o neurônio pós-sináptico imediato destes anfíbios (Cooper et al., 1996).

Os peptídios são agrupados em famílias, dependendo da similaridade de suas estruturas (e.g., seqüência de aminoácidos) e dois aspectos merecem atenção: (1) famílias, nas quais genes pró-peptídios ou RNAm compartilham de uma ou mais seqüências curtas, sendo expressos por diferentes grupos celulares na mesma espécie; (2) famílias, nas quais os peptídios expressos por grupos de células homólogas repartem seqüências geralmente idênticas, com pequenas variações. A primeira categoria, cujos exemplos são representados pelos peptídios opióides e a família das taquicininas, implica que o ligante natural pode divergir em subtipos de receptores, que discriminam tênues diferenças no seu sequenciamento. Apesar de alguns peptídios possuírem subtipos de receptor próprios (vasopressina, somatostatina), em outros casos, como as taquicininas e os peptídios opióides, os múltiplos subtipos de receptores prognosticam a definição final dos diversos ligantes naturais (Cooper et al., 1996).

Nos casos em que a forma pró-peptídio pode dar lugar à diferentes agonistas, é possível – embora não amplamente comprovado – que mais do que um peptídio mensageiro é liberado conjuntamente. A noção da coexistência de outros transmissores com os peptídios, conduziu a uma reflexão acerca de haver neurônios verdadeiramente “peptidérgicos” ou somente àqueles, nos quais um peptídio ou dois ampliam o municiamento de moléculas mensageiras disponíveis (Cooper et al., 1996).

De qualquer forma, o neurônio pode ser capaz de transmitir uma mensagem “enriquecida”, empregando mais do que um único tipo de transmissor e, este conceito revolucionário impulsionou outra questão: se o peptídio não é a molécula sinalizadora exclusiva, mas a menor, uma fração percentual da capacidade de sinalização do terminal nervoso, então como eles afetam os sinais transmitidos na coexistência com aminoácidos ou monoaminas? Infelizmente, exceto pelo circuito opióide no hipocampo, recentemente desvendado, esse mecanismo permanece desconhecido. Não obstante este fato, no sistema nervoso autônomo, segundo Tomas Hökfelt e colaboradores (1994), encontra-se pelo menos um peptídio em cada neurônio estudado dos sistemas simpático, parassimpático e entérico, alguns com sólidas interações com monoaminas. Além disso, sabe-se que o peptídio intestinal vasoativo (VIP), liberado diante de alta frequência nos terminais colinérgicos, aumenta o controle parassimpático da salivação, através da elevação do fluxo sanguíneo glandular. O neuropeptídio Y (NPY), encontrado em muitos neurônios simpáticos, sensibiliza o músculo liso, conhecido alvo adrenérgico.

Portanto, efeitos dos agonistas ou antagonistas peptídicos, podem alterar o fluxo de informação neuronal, através da perturbação das relações simbióticas normais existentes entre essas células. Outras ações dos peptídios, embora não necessariamente na coexistência com transmissores associados aos aminoácidos ou monoaminas, tem sido relatados com irregularidade: aumento ou redução da quantidade de transmissor liberado na aplicação de um estímulo e elevação ou diminuição da resposta da célula-alvo (na sua amplitude ou duração, ou em ambos). Por exemplo, o VIP acentua vigorosamente a resposta do AMPc nos neurônios corticais à baixas doses de noradrenalina e galanina, modificando a liberação de acetilcolina no hipocampo ventral. Não seria presunção considerar que o peptídio freqüentemente “embeleza” o que o transmissor primário procura realizar numa conexão neuronal. Tal efeito, pode ser fortalecer ou prolongar as ações do transmissor primário, especialmente nas situações onde a freqüência é mais alta do que normalmente (Cooper et al., 1996).

O peptídio pode prover uma parte do sinal intraneuronal, visando alterar a taxa de produção do transmissor primário, e ainda pode haver locais, nos quais o próprio peptídio pode cumprir todos os efeitos do transmissor primário (Cooper et al., 1996).

É claro que, aceitando-se o fenômeno da coexistência de uma ou mais substâncias transmissoras, surge um novo problema logístico para os neurônios que utilizam peptídios: como coordenar a síntese dos peptídios com a dos transmissores (ver anteriormente, que esses últimos, podem ser produzidos na sinápsse, sendo freqüentemente re-acumulados após sua liberação, mas que os peptídios só podem ser produzidos nos ribossomos e não nas terminações

nervosas) e como decidir quando incluir nessa transmissão o peptídeo? (Cooper et al., 1996)

A farmacologia do NPY ou neurotensina pode ser mais apropriadamente compreendida, como fazendo parte do quadro total da farmacologia noradrenérgica central, dados os graus nos quais estes dois peptídeos podem participar na transmissão neuronal monoaminérgica. De maneira relativamente modesta o número de respostas, nas quais os mensageiros peptídicos podem operar (e.g., regulação direta dos canais de Na^+ , K^+ e/ou Ca^{2+} ou modulação mediada por seus segundos mensageiros), elevam de modo intenso as possibilidades de sinalização que podem ocorrer através da interação entre a liberação dependente da frequência e da difusão e os sítios da resposta (Cooper et al., 1996).

Estudos recentes, tem auxiliado no esclarecimento dos efeitos oriundos da síntese peptídica nos tratamentos com drogas ou em outras perturbações experimentais, que alteram os níveis de coexistência entre aminas em uma determinada classe de neurônios (Cooper et al., 1996).

Além disso, o exame de genes de alguns neuropeptídeos tem revelado elementos genéticos reguladores que realizam a transcrição e influenciam a sensibilidade aos hormônios gonadais (oxitocina, vasopressina e pró-encefalina) ou os segundos mensageiros intracelulares (liberação de VIP, pró-encefalina, neurotensina, corticotrofina e pró-somatostatina), promovendo uma evidência direta da independência dos co-transmissores.

Em diversos sistemas peptídicos, evidências farmacológicas sugerem que os catabólitos dos peptídios secretados podem ter real valor de sinalização, tanto sobre o neurônio que o liberou, como sobre o neurônio pós-sináptico (Cooper et al., 1996).

PEPTÍDIOS OPIÓIDES

Em 1975, na cidade de Aberdeen, Hughes e colaboradores conseguiram isolar do cérebro dois pentapeptídios, que competem intensamente com drogas semelhantes à morfina pela ligação a receptores no cérebro e que apresentam ações farmacológicas muito semelhantes àsquelas da própria morfina (Rang et al., 1997).

Esse trabalho excepcional demonstrou que as ações até então misteriosas da morfina derivavam de sua capacidade de simular as ações de uma família de mediadores endógenos: os peptídios opióides. Esse resultado altamente satisfatório alimentou expectativas de que a descoberta de outros neuropeptídios pudesse, da mesma forma, lançar luz sobre as ações de outros tipos de droga que afetam o sistema nervoso central e apontar o caminho para o desenvolvimento de drogas novas e potencialmente úteis.

No caso, nenhuma das expectativas foi atingida: as drogas semelhantes à morfina continuam a ser a única classe conhecida a atuar pela simulação das ações dos peptídios e, até o momento, não foi modelado nenhum análogo não-peptídico, produzindo efeitos clínicos úteis, com base nas estruturas de peptídios endógenos conhecidos (Rang et al., 1997).

Estudos de clonagem demonstraram que os peptídios opióides, definidos como peptídios com efeitos farmacológicos semelhantes aos dos opiáceos, são codificados por genes distintos, cujos produtos são, respectivamente, a pré-pró-opiomelanocortina (POMC), a pré-pró-encefalina (ou pré-pró-encefalina A) e a pré-pró-dinorfina (pré-pró-encefalina B). Todos esses precursores contêm seqüências de alguns peptídios opióides. Hughes et al. (1975) observaram que a seqüência da metencefalina está contida na seqüência de um hormônio hipofisário: a β -lipotropina (β -LPH) (Rang et al., 1997).

Simultaneamente, em outros laboratórios, foram descobertos três outros peptídios – as endorfinas α , β e γ - que também compreendem faixas da molécula de β -lipotropina [α -endorfina (β -LPH₆₁₋₇₆), γ -endorfina (β -LPH₆₁₋₇₇) e β -endorfina (β -LPH₆₁₋₉₁); denominada também de “fragmento C” (Cooper et al., 1996)]. Inicialmente, suspeitou-se que as encefalinas pudessem ser artefatos decorrentes da fragmentação proteolítica de mediadores maiores, mas logo ficou claro que elas existiam independentemente e que, na verdade, eram efetivamente derivadas de outros produtos de genes: a pró-encefalina e a pró-dinorfina, e não propriamente do POMC. O POMC atua como fonte de ACTH, de hormônios

estimulantes dos melanócitos (MSH) e da β -endorfina, e não como fonte de encefalina (Rang et al., 1997).

A expressão das proteínas precursoras varia enormemente nos diferentes tecidos e regiões cerebrais (Rang et al., 1997).

A POMC e seus derivados peptídicos, por exemplo, são encontrados principalmente na hipófise (pituitária anterior, no lobo intermédio) e no hipotálamo (área do núcleo arcuatus), enquanto as encefalinas e seus precursores são encontrados em todo o sistema nervoso central e periférico, bem como em outros órgãos, como a medula supra-renal (Rang et al., 1997).

Estudos com imunofluorescência demonstram que esses peptídios e seus precursores ficam claramente restritos a células específicas e permitem também reconhecer padrões distintos de processamento que conduzem à produção de peptídios diferentes a partir do mesmo precursor em diferentes tecidos e regiões cerebrais (Rang et al., 1997).

Uma revisão feita por Martinez e Potier (1986) enumera 23 peptídios diferentes derivados da POMC, todos os quais ocorrem no cérebro ou na hipófise e evidenciam atividade biológica. Nenhum deles é classificado como um peptídio opióide, uma vez que muitos, relacionados com o ACTH ou com o MSH, não têm ações semelhantes às dos opiáceos. Os mediadores sobre os quais temos maior conhecimento são a β -endorfina, a metencefalina, a leu-encefalina e a dinorfina.

No cérebro, a β -endorfina é encontrada principalmente em neurônios que se projetam do hipotálamo para o tálamo e tronco cerebral, enquanto as encefalinas são dectadas principalmente em interneurônios curtos em muitas regiões do cérebro (Rang et al., 1997). O mais importante agonista endorfínico derivado do POMC é a 31-aminoácido-C-terminal fragmento de β -endorfina, o mais potente dos opióides naturais. Os fragmentos N-terminal das β -endorfinas são muito menos potentes e análogos sem o N-terminal tirosina (denominado versão des-Tyr) perdem toda a atividade opióide. Nas células da hipófise anterior, que secretam corticotrofina, o POMC é processado amplamente para formar corticotrofina e uma forma inativa de β -endorfina; já que nas células do lobo intermédio e nos neurônios do núcleo arcuatus, o mesmo precursor é processado para formar α -MSH e β -endorfina ativa. A met⁵-encefalina e a leu⁵-encefalina são expressas em sistemas neuronais separados originados nos neurônios POMC e são muito mais penetrantemente distribuídos ao longo do sistema nervoso central e periférico, incluindo a medula adrenal e o sistema nervoso entérico. A clonagem e o sequenciamento do RNAm da pró-encefalina, que inicia-se com o RNAm proveniente do tecido medular adrenal, produz um inesperado dividendo em que o precursor exhibe múltiplas cópias dos dois peptídios numa razão de 6:1 de met⁵-para leu⁵-encefalina, tendo sido relatado em diversas regiões cerebrais e em ensaios entéricos.

Estes achados dissolvem o mistério relativo a existência de dois peptídeos similares. O peptídeo pró-dinorfina consiste de um C-terminal agregado nas formas de leu⁵-encefalina, que surge de genes e RNAm diferentes, que codificam a produção de quatro peptídeos principais, denominados dinorfina A, dinorfina B, e duas neoendorfinas, α e β (Cooper et al., 1996).

Este C-terminal agregado ao peptídeo, faz com que este tenha uma atuação de um potente agonista opióide sem sofrer a clivagem que ocorre na forma encefalina, sendo que após o seu mapeamento, representam uma terceira série separada de distribuição nos neurônios centrais e periféricos. Cada uma dessas classes de neurônios (associados à POMC, encefalinas e dinorfinas) contém β -endorfina, encefalina ou dinorfina com distintas características morfológicas. Os neurônios relacionados com a β -endorfina formam sistemas de projeções longas que alcançam o sistema endócrino, localizado no hipotálamo medial, diencéfalo e ponte. Os peptídeos derivados da pró-encefalina e pró-dinorfina, são geralmente encontrados em neurônios com pequenas e modestas projeções, em grupos que são muito dispersos. Em algumas regiões estes peptídeos mostram intrigantes relações. Por exemplo, os neurônios vinculados às encefalinas, projetam-se do córtex entorrinal para a camada molecular do girus dentato (giro denteado) no hipocampo, enquanto que àqueles associados às dinorfinas projetam-se do girus dentato para as células piramidais na área CA₃. Na medula espinhal, interneurônios intrínsecos contém dinorfina, ao passo que axônios longos descendentes da ponte e medula albergam encefalina.

Adicionalmente, todos esses sistemas peptídicos presumivelmente vinculam-se à outros transmissores não-peptídicos (Cooper et al., 1996).

RECEPTORES OPIÓIDES.

As ações dos peptídios opióides, como as dos opiáceos sintéticos, são mediadas por três tipos distintos de receptor (μ , δ e κ). A evidência direta de que os opióides são reconhecidos por receptores específicos teve origem em estudos de ligação (Snyder et al., 1973; Brownstein, 1993), sendo que estudos farmacológicos subsequentes (Wood et al., 1988) concluíram que três receptores, denominados μ , δ e κ , medeiam os seus principais efeitos farmacológicos.

Um quarto subtipo, σ , foi postulado para poder explicar os efeitos “disfóricos” (ansiedade, alucinações, sonhos desagradáveis) produzidos por alguns opiáceos (Rang et al., 1997).

Esses são considerados atualmente, como não sendo verdadeiros receptores opióides, pois muitos outros tipos de medicamentos psicotrópicos também interagem com eles, e seu papel biológico continua obscuro (Walker et al., 1990).

Foi demonstrado pela clonagem dos receptores, que os três principais subtipos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, e agem inibindo a adenilato-ciclase, reduzindo, dessa forma, o conteúdo intracelular de AMPc (West et al., 1983; Childers, 1993). Por esse meio, os opióides promovem a abertura dos canais de potássio e inibem a abertura dos canais de cálcio operados por voltagem (North, 1993), que são os principais efeitos observados no nível da membrana. Esses efeitos na membrana, agem reduzindo tanto a excitabilidade neuronal (pois a maior condutância do potássio acarreta em hiperpolarização) quanto a liberação de transmissores (em virtude da inibição da entrada de cálcio). Portanto, o efeito global é inibitório à nível celular (Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997), exceto no hipocampo, onde ações excitatórias são tão profundas que podem induzir convulsões (Cooper et al., 1996). Assim, os opióides aumentam a atividade em algumas vias neuronais, presumivelmente por suprimirem a deflagração dos interneurônios inibitórios (Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997). Os opióides variam não apenas em sua especificidade em relação aos receptores, mas também em sua eficácia no nível dos diferentes tipos de receptores, de modo que, alguns fármacos agem como agonistas sobre um tipo de receptor e como antagonistas ou agonistas parciais em outro, produzindo um quadro farmacológico muito complicado. A β -endorfina e a metencefalina atuam principalmente nos receptores μ , a leu-encefalina nos receptores δ e a dinorfina nos κ . Produzem analgesia quando injetadas localmente no cérebro, e suas ações celulares são basicamente inibitórias (Rang et al, 1997).

As respostas farmacológicas associadas a esses três tipos de receptor e o comprometimento dos peptídeos opióides na analgesia e na dor são discutidos separadamente mais à frente. A estimulação de alta frequência na ativação das células granulares do giro dentado, que contém dinorfina, conduz a uma supressão naloxona-sensível de IPSPs (potencial pós-sináptico tardio), arquivados nas células piramidais na área CA₃, no entanto, essa alegação inicial de ação sináptica foi logo atribuída a supressão opióide pré-sináptica na liberação de noradrenalina. Um segundo efeito sináptico foi então detectado como sendo uma resposta excitatória embotada, durante a estimulação das células granulares do giro dentado por elas próprias (as únicas que contém dinorfina); contudo, esse efeito tem-se mostrado ser um mecanismo totalmente novo, no qual a dinorfina dendrítica atua como um transmissor retrógrado, visando reduzir a liberação pré-sináptica do glutamato (Cooper et al., 1996).

Entretanto, foi em uma análise mais pormenorizada da habilidade, muitas vezes relatada, da naloxona em bloquear a potenciação a longo-prazo hipocampal (LTP), que emergiram evidências da existência de ações sinápticas adicionais, além daquelas convencionais: antagonistas do receptor do subtipo μ bloqueiam a LTP induzida nos neurônios da área CA₃, através da estimulação das fibras musgosas e, ainda antagonistas dos receptores μ e δ bloqueiam a LTP produzida pela estimulação lateral associada à pró-encefalina. Além disso, a LTP produzida nas células granulares do giro dentado, pela estimulação de alta frequência no hilo do hipocampo, é aumentada com agonistas κ e, este efeito é bloqueado com anticorpos anti-dinorfina ou antagonistas κ -seletivos (Cooper et al., 1996).

A situação na qual uma família de drogas não-peptídicas simula as ações de peptídios endógenos parece ser peculiar ao campo dos opióides (Rang et al., 1997).

DROGAS QUE AFETAM A TRANSMISSÃO MEDIADA POR OPIÓIDES.

O termo *opióide* aplica-se a qualquer substância que produz efeitos semelhantes aos da morfina e que são bloqueados por antagonistas tipo naloxona (Rang et al., 1997). Inclui vários neuropeptídios e análogos sintéticos, cuja estrutura pode ser bastante diferente daquela da morfina. O termo mais antigo, opiáceo, é mais restritivo, significando medicamentos semelhantes à morfina com uma íntima semelhança estrutural com esta, excluindo dessa forma os peptídios e muitos análogos sintéticos (Herz, 1993; Rang et al., 1997).

O ópio é um extrato do suco da papoula *Papaver somniferum*, e contém muitos alcalóides aparentados à morfina. A estrutura da morfina foi determinada em 1902 e, desde então, foram estudados muitos compostos semi-sintéticos (produzidos por modificação química da morfina) e analgésicos totalmente sintéticos. Além dos compostos semelhantes à morfina, o ópio contém também papaverina, que é um relaxante do músculo liso. Desta maneira, têm-se (Rang et al., 1997):

Análogos da morfina. São compostos cuja estrutura é intimamente aparentada com a da morfina e, o mais das vezes, sintetizados a partir dela. Eles podem ser agonistas (por exemplo, morfina, heroína e codeína), agonistas parciais (por exemplo, nalorfina e levalorfan), ou antagonistas (por exemplo, naloxona).

Derivados sintéticos com estruturas não relacionadas com a da morfina.

- série da fenilpiperidina [por exemplo, petidina (também conhecida como meperidina) e fentanil]
- série da metadona (por exemplo, metadona e dextroprozocina)
- série de benzomorfan (por exemplo, pentazocina e ciclazocina)
- derivados semi-sintéticos de tebaína (por exemplo, etorfina e buprenorfina)

MORFINA. A morfina é um derivado do fenantreno, com dois anéis planares (A e B) e duas estruturas anulares alifáticas (C e D), que ocupam um plano aproximadamente em ângulos retos com A e B (Rang et al., 1997).

NALOXONA. A naloxona é considerada o melhor exemplo de antagonista opióide puro. Com base nos estudos de fixação, parece possuir uma alta afinidade pelos receptores μ , δ e κ . A naloxona bloqueia as ações dos peptídeos opióides endógenos, assim como aquelas dos medicamentos semelhantes à morfina. A naloxona têm como principal indicação clínica tratar a depressão respiratória causada pela superdosagem de opióides e, ocasionalmente, reverter o efeito dos analgésicos opióides, usados durante o trabalho de parto, sobre a respiração do recém-nascido. Em geral, é administrada na veia e seus efeitos são produzidos imediatamente. É metabolizada rapidamente pelo fígado e seu efeito dura apenas 1-2 horas (Rang et al., 1997).

Os receptores opióides distribuem-se largamente no cérebro e os opióides são eficazes como analgésicos quando administrados pela via intratecal, assim como pela via sistêmica, implicando que uma ação sobre a medula espinhal pode ser responsável por seu efeito analgésico. Entretanto, a injeção de morfina na região PAG (àrea cinzenta periaquedutal) também produz uma analgesia acentuada, que pode ser prevenida pela interrupção cirúrgica da via descendente para NRM (*nucleus raphe magnus*) ou pelo bloqueio farmacológico da síntese de 5-HT com p-clorofenilalanina. Este último procedimento interrompe a via de 5-HT que vai de NRM para o corno dorsal (Rang et al., 1997).

A morfina é eficaz em muitos tipos de dor aguda e crônica, porém os opióides em geral são menos úteis em várias síndromes dolorosas de origem neuropática, tais como o membro fantasma e outros tipos de dor de desafferenciação, neuralgia do trigêmio etc (Rang et al., 1997).

Além de ser antinociceptiva, a morfina possui um importante papel na redução do componente afetivo da dor, efeito este que deve envolver certamente áreas supramedulares, incluindo possivelmente o sistema límbico, que está envolvido provavelmente no efeito responsável pela produção da euforia (Koob et al., 1988).

A morfina produz uma poderosa sensação de contentamento e bem-estar. Esse é um componente importante de seu efeito analgésico, pois a agitação e ansiedade associadas com uma enfermidade ou uma lesão dolorosa são, desta forma, reduzidas.

A euforia parece ser mediada através dos μ -receptores e parece ser balanceada pela disforia associada com a ativação dos κ -receptores (Rang et al., 1997).

Um grau mensurável de depressão respiratória, que resulta em um aumento na P_{CO_2} arterial, ocorre com uma dose analgésica normal de morfina ou de compostos correlatos. Os dois efeitos são mediados pelos μ -receptores, e o equilíbrio entre eles é, portanto, o mesmo para a maioria dos opióides. O efeito depressor está associado com uma queda na sensibilidade do centro respiratório à P_{CO_2} , não sendo afetado o impulso hipóxico mediado através dos quimiorreceptores periféricos. O local e o mecanismo de ação dos opióides sobre a respiração não são conhecidos (McQueen, 1983). Os neurônios no próprio centro respiratório medular não parecem ser deprimidos diretamente, porém os opióides aplicados na superfície central do bulbo, na região onde a quimiossensibilidade ao CO_2 é máxima, exercem um poderoso efeito depressor sobre a respiração (Rang et al., 1997).

A depressão respiratória induzida pelos opióides não é acompanhada por depressão nos centros medulares que controlam a função cardiovascular (ao contrário da ação dos anestésicos e de outros depressores gerais). Isto significa que a depressão respiratória produzida pelos opióides é muito mais bem tolerada que um grau semelhante de depressão causada por, digamos, um barbitúrico; não obstante, a depressão respiratória é o efeito indesejado mais incômodo desses medicamentos e, diferentemente daquela devida aos agentes depressores gerais

do sistema nervoso central (SNC), ocorre com doses terapêuticas. Essa é a causa mais comum de morte na intoxicação opióide aguda (Rang et al., 1997).

A supressão da tosse, surpreendentemente, não se correlaciona intimamente com as ações analgésicas e depressoras respiratórias dos opióides, podendo representar uma ação sobre um tipo diferente de receptor.

Em geral, uma maior substituição no grupo -OH fenólico da morfina (posição 3) faz aumentar a atividade antitussiva em relação à atividade analgésica (Rang et al., 1997).

As náuseas e os vômitos ocorrem em até 40% dos pacientes aos quais é administrada a morfina e não parecem ser separáveis do efeito analgésico entre uma ampla gama de analgésicos opióides (Rang et al., 1997).

O local de ação é a *área postrema* (zona deflagradora quimiorreceptora), uma região do bulbo onde os estímulos químicos de muitos tipos podem dar início ao vômito (Rang et al., 1997).

A constrição pupilar é um efeito de mediação central, causado pela estimulação mediada pelos μ e κ -receptores do núcleo oculomotor. As pupilas puntiformes constituem uma característica diagnóstica importante na superdosagem com morfina e medicamentos correlatos, pois a maioria das outras causas de coma e de depressão respiratória produzem dilatação pupilar (Rang et al., 1997).

A morfina causa acentuado aumento no tônus e motilidade reduzida em muitas partes do sistema gastrintestinal, resultando em constipação ou obstipação. Observa-se uma demora no esvaziamento gástrico que pode retardar consideravelmente a absorção de outros medicamentos. A pressão no trato biliar aumenta significativamente em virtude da contração da vesícula biliar e da constrição do esfíncter biliar. Este efeito é deletério nos pacientes que sofrem de cólica biliar devida a cálculos vesiculares, quando a dor pode ser aumentada em vez de aliviada. A elevação na pressão intrabiliar pode causar aumento transitório na concentração de amilase e lipase no plasma. É provável que a ação da morfina sobre o músculo liso visceral seja mediada principalmente através dos plexos nervosos intramurais, pois o aumento no tônus é reduzido ou abolido pela atropina. Isto é mediado, em parte, por uma ação central da morfina, pois a injeção intraventricular de morfina inibe os movimentos gastrintestinais propulsivos. O efeito local da morfina e de outros opióides sobre os neurônios do plexo mioentérico é inibitório, ocorrendo hiperpolarização que resulta de maior condutância do potássio.

Os receptores envolvidos nesses efeitos são do tipo μ , κ e δ , com muita variação entre os diferentes preparados e espécies (Rang et al., 1997).

A morfina induz a liberação de histamina pelos mastócitos, por uma ação independente dos receptores opióides. Essa liberação de histamina pode causar efeitos locais, tais como urticária e prurido no local da injeção, ou efeitos sistêmicos, ou seja, broncoconstrição e hipotensão.

O efeito broncoconstritor pode ter consequências sérias para os pacientes asmáticos, aos quais a morfina não deve ser administrada. Outros opióides, exceto aqueles intimamente aparentados à morfina, não induzem a liberação de histamina (Rang et al., 1997).

Hipotensão e bradicardia ocorrem com as altas doses da maioria dos opióides, sendo devidas a uma ação sobre o bulbo. Com a morfina e medicamentos semelhantes, a liberação de histamina pode contribuir para a hipotensão (Rang et al., 1997).

Os efeitos sobre outros músculos lisos, além daqueles do trato gastrointestinal e dos brônquios são leves, embora possa ocorrer ocasionalmente um espasmo dos ureteres, da bexiga e do útero. Os opióides exercem também complexos efeitos imunossupressivos, que podem ser importantes como um elo entre o sistema nervoso e a função imune (Sibinga et al., 1988).

A tolerância aos opióides (i.é., um aumento na dose necessária para produzir determinado efeito farmacológico) instala-se com rapidez (12-24 horas) e é demonstrada prontamente. A tolerância é um fenômeno geral dos ligantes dos receptores opióides, independentemente do tipo de receptor sobre o qual elas agem (Rang et al., 1997). Dependência é um fenômeno diferente, muito mais difícil de definir e avaliar, e envolve dois componentes separados, ou seja, dependência física e psicológica (Koob et al., 1988). A dependência física caracteriza-se por uma síndrome de abstinência bem definida.

Os mecanismos pelos quais a tolerância se instala foram estudados extensamente (Nestler, 1993) e certas possibilidades podem ser excluídas, tais como maior degradação metabólica, afinidade reduzida dos opióides por seus receptores, regulação descendente dos receptores opióides e inibição da liberação de opióides endógenos.

A absorção dos congêneres da morfina pela via oral é variável. A morfina propriamente dita é absorvida lenta e irregularmente, sendo administrada comumente por injeção intravenosa ou intramuscular; entretanto, a morfina oral é usada freqüentemente no tratamento da dor crônica. A maioria dos medicamentos semelhantes à morfina sofre considerável metabolismo de primeira passagem, sendo portanto, consideravelmente menos potentes quando tomados oralmente que quando injetados (Rang et al., 1997).

A meia-vida plasmática da maioria dos análogos da morfina é de 3-6 horas. A conjugação com o glicuronídeo nos grupos 3- e 6-OH ocorre no fígado, e esses glicuronídeos constituem uma fração considerável do medicamento na corrente sangüínea. Os glicuronídeos da morfina são excretados na urina, razão pela qual a dose deverá ser reduzida nos casos de insuficiência renal. Os glicuronídeos também alcançam o intestino através da excreção biliar. Neste local são hidrolisados, sendo a maior parte da morfina reabsorvida (circulação êntero-hepática) (Rang et al., 1997).

Devido à baixa capacidade de conjugação nos recém-nascidos, os medicamentos semelhantes à morfina apresentam duração de ação muito mais longa; levando-se em conta que até mesmo um pequeno grau de depressão respiratória pode ser perigoso, os congêneres da morfina não devem ser utilizados no período neonatal, nem devem ser usados como analgésicos durante o trabalho de parto (Rang et al., 1997).

COMPORTAMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE NOS MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE, ESPECIALMENTE NO “LEC”.

A capacidade da naloxona, um antagonista de receptor opióide, em potencializar os efeitos de doses subefetivas de clordiazepóxido, diazepam e buspirona foram avaliados em camundongos suíços no elevado “LEC” por Belzung et al. (1997a), que concluíram: o diazepam na dose de 0,5 mg/kg, o clordiazepóxido na dose de 2,5 mg/kg e a buspirona na dose de 2 mg/kg, foram inefetivas *per se*, porém quando combinadas com a naloxona na dose de 10,0 mg/kg, produziram um aumento na proporção de entradas nos braços abertos, semelhante ao ocorrido com doses mais altas dos agentes ansiolíticos estudados (diazepam, 1,5 mg/kg; clordiazepóxido, 5,0 mg/kg; buspirona, 4,0 mg/kg).

A naloxona na dose de 10,0 mg/kg isoladamente não motivou nenhum efeito intrínscico. Contrastando com essas afirmações, Agmo et al. (1998) declaram que estudos prévios tem demonstrado que a naloxona bloqueia os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (BDZ) em diversos modelos de ansiedade, incluindo o "LEC". Esses autores asseveram que, embora a naloxona tende a ligar-se preferencialmente ao receptor opióide *mu*, esta seletividade é muito baixa e, assim, o subtipo de receptor opióide importante na modulação das ações ansiolíticas dos benzodiazepínicos no "LEC", permanece ainda desconhecido. Desta maneira, esses pesquisadores investigaram a habilidade, de antagonistas seletivos dos principais subtipos de receptor opióide, em bloquear os efeitos ansiolíticos, induzidos pelo clordiazepóxido em camundongos suíços submetidos ao teste de ansiedade elevado "LEC". Primeiramente estes autores observaram que o clordiazepóxido na dose de 5,0 mg/kg, produziu aumento na proporção, bem como no número, de ingressos nos braços abertos, sem que ocorressem modificações nas entradas nos braços fechados, sendo que nas doses mais baixas esse benzodiazepínico foi inefetivo.

Assim, subseqüentemente empregaram os antagonistas: beta-funaltrexamina, um antagonista do subtipo *mu*, nas doses de 10,0 e 20,0 mg/kg, o naltrindole, um antagonista *delta*, na dose de 10,0 mg/kg e a nor-binaltorfimina, um antagonista *kappa*, nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg, que foram então combinados com o clordiazepóxido na dose de 5,0 mg/kg.

Os resultados desses ensaios demonstraram que a beta-funaltrexamina na dose de 10,0 mg/kg reduziu os efeitos produzidos pelo benzodiazepínico, enquanto que na dose de 20,0 mg/kg esses efeitos foram completamente bloqueados; a nor-binaltorfimina foi ineficaz na dose de 2,5 mg/kg, porém inibiu inteiramente as ações do clordiazepóxido na dose de 5,0 mg/kg; o naltrindole mostrou-se inefetivo e nenhum desses antagonistas afetou o comportamento dos animais no “LEC” quando administrados isoladamente. Apesar de parecerem conflitantes, à primeira vista, os resultados alcançados nestes dois trabalhos sugerem que a naloxona potencializa somente os efeitos de subefetivas doses de benzodiazepínicos, enquanto bloqueia as suas ações ansiolíticas nas doses eficazes, avaliadas com camundongos suíços no “LEC”. Além disso, o segundo trabalho de pesquisa mostra que os subtipos de receptores opióides *mu* e *kappa* são importantes para as ações ansiolíticas do clordiazepóxido no elevado “LEC”, propondo uma interação entre os sistemas GABAérgico e opióide. Desde 1985, Rodgers e colaboradores sugerem que, pelo menos alguns efeitos comportamentais dos benzodiazepínicos podem envolver uma interação com mecanismos opióides endógenos, visto que o clordiazepóxido nas doses de 10,0 e 20,0 mg/kg, i.p., induziu uma redução dose-dependente na atividade locomotora espontânea e na postura “rearing” em camundongos e, que embora a naloxona na dose de 1,0 mg/kg tenha sido destituída de efeitos e não tenha alterado mudanças comportamentais, induzidas por baixas doses de clordiazepóxido, ela aumentou os efeitos depressores do benzodiazepínico na dose de 20,0 mg/kg sobre a atividade locomotora. Em oposição a essas afirmações, Agmo et al. dez anos mais tarde (1995), avaliaram o papel do sistema opióide em diversos modelos animais.

Acerca do efeito anticonflito do clordiazepóxido, do diazepam e do pentobarbital no procedimento Vogel modificado, utilizaram estes autores, a morfina, inefectiva *per se*, que foi combinada com doses subefetivas dos benzodiazepínicos, visando detectar possíveis potenciações. Os tratamentos efetuados dessas combinações reduziram a postura “licking” no Vogel, bem como no teste de lambedura, quando não era administrado choque. Subseqüentemente diversas doses dos benzodiazepínicos e pentobarbital foram administradas em combinação com variadas doses de naloxona. Uma inibição do efeito anti-conflito foi obtida de forma dose-dependente.

Em um ensaio adicional foi demonstrado que a naloxona bloqueou os efeitos do diazepam no elevado “LEC” (Agmo et al., 1995). Deficiências motoras produzidas pelos benzodiazepínicos e pelo pentobarbital foram avaliadas no teste “rotarod” e verificou-se que não foram antagonizadas pela naloxona. Desta maneira, concluem os autores que os opióides são importantes nas ações anti-conflito, porém não sobre os efeitos motores dos benzodiazepínicos. Vários relatos associados ao fato de que a naloxona bloqueia os efeitos anti-conflito do diazepam e do clordiazepóxido, e atenua a perda de inibição comportamental produzida pelos BDZ em tarefas envolvendo punição e não-recompensa, sugerem o envolvimento de opióides endógenos na ação ansiolítica dos benzodiazepínicos (Tripp et al., 1991 e 1992).

Entretanto, a capacidade da naloxona em antagonizar os efeitos anti-conflito dos benzodiazepínicos não é universal, mas horário-específica (i.é., depende do horário), segundo Tripp et al. (1992), que investigaram a importância de se cronometrar os períodos de conflito e controlar o reforço da interação naloxona (3,0 mg/kg, i.p.)/clordiazepóxido (5,0 mg/kg, i.p.), em horários discriminados e sucessivos, com intervalos de não-recompensa similares na duração e na frequência. Os resultados desses experimentos sugerem que o sistema opióide endógeno está envolvido na ação ansiolítica dos benzodiazepínicos quando os animais estão se adaptando ao conflito recentemente introduzido. Logo que a adaptação ocorra, outro sistema de neurotransmissores medeia as ações dos benzodiazepínicos.

Esta habilidade da naloxona em bloquear os efeitos dos BDZ clordiazepóxido e diazepam, avaliada em camundongos suíços e Balb/c sujeitos ao teste de ansiedade de escolha clara/escuro ou ao paradigma de mensuração do comportamento exploratório espontâneo, produziu resultados interessantes (Belzung et al., 1997b). Em camundongos suíços, a naloxona (5,0 ou 10,0 mg/kg) suprimiu completamente ou parcialmente os efeitos ansiolíticos do clordiazepóxido (5,0 mg/kg) e do diazepam (1,0 mg/kg) no teste claro/escuro, enquanto que administrada isoladamente foi ineficaz. Nenhum destes compostos afetou a locomoção no teste de exploração livre. Já na linhagem de camundongos Balb/c a naloxona não reduziu a ação ansiolítica do BDZ no teste claro/escuro. Além do mais, a naloxona não antagonizou a diminuição neofóbica observada após o tratamento ansiolítico em camundongos Balb/c no modelo de livre exploração.

Nesta linhagem, os BDZ produziram um aumento na atividade locomotora, ao passo que a naloxona obteve efeito oposto. O efeito estimulante dos BDZ sobre a atividade locomotora foi abolido pela naloxona.

Como a naloxona (2,0 mg/kg) reverteu a hipertermia induzida pela morfina em ambas linhagens, suíço e Balb/c, diferenças em possíveis fatores farmacocinéticos entre as duas linhagens, podem fugir a regra, como uma explicação para o fracasso da naloxona em antagonizar os efeitos ansiolíticos em camundongos Balb/c. Em camundongos C57BL/6, testados quanto à ansiedade, no elevado "LEC", acerca da memória emocional, no paradigma de esquiva passiva ou memória espacial, no "radial maze", encontrou-se: no "LEC", o clordiazepóxido a 2,5 mg/kg foi ineficaz *per se*, mas quando combinado com a naloxona (10,0 mg/kg), aumentou a proporção de entradas nos braços abertos, similarmente ao que ocorreu com a dose mais alta de clordiazepóxido (5,0 mg/kg); os ingressos nos braços fechados foram elevados com a administração de clordiazepóxido (2,5 mg/kg) isoladamente, porém unicamente a naloxona (10,0 mg/kg) ou sua combinação com o clordiazepóxido não promoveram modificações nessa mensuração; no teste de esquiva passiva, o clordiazepóxido a 2,5 mg/kg diminuiu a latência à entradas no compartimento associado com o choque elétrico nas patas.

Por outro lado, na dose de 1,25 mg/kg, sozinho ou em combinação com a naloxona (10,0 mg/kg) não produziu nenhum efeito; finalmente, no "radial arm maze", o clordiazepóxido (5,0 mg/kg) induziu amnésia, enquanto que na dose de 2,5 mg/kg, sozinho ou com a naloxona (10,0 mg/kg), não se observou efeitos sobre a aprendizagem.

Portanto, deduzem os autores (Belzung et al., 1998), a naloxona potencializa as ações ansiolíticas do clordiazepóxido, mas não aquelas relacionadas com a amnésia. Em outro experimento envolvendo a memória espacial, Gallagher et al. (1983), estudaram ratos treinados no “eight-arm radial maze” que foram desafiados através da colocação do “labirinto” em novo meio-ambiente. A administração de antagonistas opióides, como a naloxona ou diprenorfina, após exposição ao novo ambiente significativamente melhorou a performance subsequente. O efeito da naloxona sobre a memória espacial foi atenuado quando a administração da droga ocorreu 2 horas após a exposição ao “maze”. Canli et al. (1990), investigaram em dois experimentos a influência da naloxona e naltrexona na memória espacial de ratos submetidos ao “12-arm radial maze”. No primeiro experimento, 10 ratos foram vigorosamente forçados a visitar seis braços selecionados randomicamente, e depois removidos do aparato por períodos de 30, 60 ou 240 minutos, sendo então reconduzidos ao “maze”, visando um teste de memória de livre-escolha em todos os 12 braços. Após cinco minutos de cada período, foi administrado aos animais solução salina ou naloxona (1,0 mg/kg, i.p.).

No grupo tratado com naloxona, os ratos revisitaram os mesmos braços ao quais foram forçados anteriormente (escolha forçada), menos vezes do que os animais do grupo salina, durante um subsequente teste de livre escolha. No segundo ensaio, 12 ratos mostraram uma facilitação similar relativa a memória espacial nos grupos tratados com naltrexona (0,3 mg/kg) e naloxona (1,0 mg/kg), quando comparados com o grupo controle (salina).

Estes achados demonstram os efeitos benéficos que os antagonistas opióides exercem sobre a memória espacial, fundamentados na performance do “radial maze”.

Por outro lado, Kameyama e colaboradores (1986), sugerem que o sistema opióide pode participar nas ações amnésicas induzidas por inibidores de síntese proteica (cicloeximida e anisomicina) em camundongos submetidos ao teste de esquiva passivo, já que a naloxona (0,3-10,0 mg/kg) antagonizou as respostas desses animais de maneira dose-dependente.

Corroborando com essa inter-relação (sistemas GABAérgico e opióide), Rosland et al. (1990), estudando o mecanismo associado ao antagonismo dos benzodiazepínicos diante da antinocicepção produzida pelos opióides, nos camundongos submetidos aos testes de beliscão de cauda e placa quente, verificaram que tanto em dose única como em doses repetidas, o diazepam antagonizava os efeitos antinociceptivos da morfina. Observaram ainda, que o flumazenil, um antagonista benzodiazepínico específico, revertia completamente esse efeito antagônico entre a morfina e o diazepam. Estes autores efetuaram uma espinalização na altura do nível médio da coluna torácica, que também resultou na abolição desse antagonismo, indicando que este efeito ocorre nas áreas mais altas do SNC. Além disso, demonstraram que nem o diazepam, nem o midazolam mostraram qualquer afinidade pelos receptores opióides *mu* ou *kappa* em preparações de membranas oriundas do tronco cerebral de camundongos.

Concluem esses pesquisadores, que estes resultados tomados conjuntamente com outros estudos acerca das interações entre as drogas GABAérgicas e opióides, indicam que o mecanismo mediado por benzodiazepínicos, localiza-se em níveis elevados no SNC, possivelmente no tronco encefálico, bloqueando a transmissão dos efeitos antinociceptivos dos opióides. De acordo com Lee et al. (1990), a manipulação farmacológica de receptores opióides em camundongos, influenciam os seus efeitos antinociceptivos, na exposição ao elevado “LEC”. Os cinco minutos no “LEC” foram suficientes para induzir um moderado, embora duradouro, aumento na latência de “tail-flick” em camundongos.

O pré-tratamento com um antagonista opióide, a naltrexona (0,1-10,0 mg/kg) fracassou em bloquear a anti-nocicepção induzida pelo “LEC” (tem sido sugerido que a ansiedade pode ser um fator crítico em certas formas de analgesia não-opióide): de fato, a dose mais alta na verdade, aumentou a resposta e, esse efeito não pode ser atribuído à atividade analgésica intrínseca da naltrexona. Aliás, mais apropriadamente, uma análise dos comportamentos no “LEC” sugeriu que este efeito pode ter sido secundário à uma ação ansiogênica do composto. O envolvimento de substratos não-opióides na inibição da dor, foi suportado mais adiante, pelo fracasso do tratamento crônico com morfina (7,5 mg/kg, 7 dias), que visava alterar a resposta anti-nociceptiva ou comportamental na exposição ao “LEC”. Independente do tratamento, os camundongos mostraram no re-teste com o “LEC” um perfil de ansiedade aumentado, com dados relacionados a “tail-flick”, sugerindo uma maior contribuição de fatores antecipatórios.

Rodgers e colaboradores (1984), afirmam que o tratamento com naloxona, realizado previamente à uma exposição inicial a uma nova arena, resulta em mudança comportamental significativa, quando os animais são re-testados 24 horas depois. Na tentativa de esclarecer a natureza dessa ação retardada do antagonista opióide, esses autores constituíram três ensaios com camundongos no campo-aberto. No primeiro experimento, foi administrado naloxona (0-10,0 mg/kg, i.p.) imediatamente após a sua experiência inicial na arena de teste. Quando re-testados 24 horas depois, todos os grupos submetidos ao tratamento prévio com naloxona, exibiram uma grande redução na atividade e "rearing", sem demonstrar evidências de correlação entre a dose e a resposta. No segundo ensaio, a naloxona (0-10,0 mg/kg) malogrou em induzir aversão à locais condicionados, quando administrada de acordo com o regime descrito acima. No último experimento, não foi observada nenhuma evidência de que a naloxona possa produzir uma aversão ao sabor da sacarina. Diante desses achados, os autores concluem que as mudanças comportamentais observadas neste estudo com o campo-aberto podem refletir: (a) sutis propriedades aversivas da naloxona, as quais são insensíveis aos paradigmas tradicionais ou (b) uma modulação opióide associada com a memória de experiências não dolorosas.

Desta feita, Collier et al. (1984) utilizando ratos albinos, submetidos a uma estimulação elétrica sub-convulsiva de 10s, aplicada nas células granulares do giro denteado, imediatamente após a obtenção de informações acerca do primeiro de dois ensaios no “radial maze” (associado com tarefas relacionadas à memória espacial), observaram que: a estimulação das células granulares seletivamente reduziu a probabilidade de acesso à informação contida na memória declarativa (“knowing that” um local particular do labirinto que contém alimento), enquanto permitiu a integridade da memória processual (“knowing how” para procurar alimento no labirinto). Esta deterioração de memória específica foi prevenida através do pré-tratamento com naloxona. A naloxona também melhorou a performance da memória, quando administrada em indivíduos não estimulados.

A retirada (abstinência) de opióides ou de outras drogas de seres humanos viciados, está estreitamente associada com um estado de ansiedade, que pode ser de relevância motivacional na manutenção da dependência (Schulteis et al., 1998). Tentativas anteriores, utilizando ratos em modelos relacionados aos efeitos ansiogênicos, diante da abstinência opióide, usando-se o “LEC” tem alcançado sucesso de forma irregular. Desse modo, o estudo de Schulteis e colaboradores (1998), procurou determinar se a abstinência de fármacos opióides, espontânea e a precipitada pela naloxona, poderia ser observada confiantemente em ratos induzidos à dependência em morfina, através da implantação de dois “pellets” contendo essa droga (75 mg de morfina em cada um).

Setenta e duas horas após a implantação dos “pellets” de morfina ou placebo, os ratos foram testados no elevado “LEC”. No experimento 1, os “pellets” foram removidos 8 ou 12 horas previamente à aplicação do teste; os resultados indicaram um efeito ansiogênico (redução no tempo despendido sobre os braços abertos) relativo à retirada da droga opióide no grupo de 8 horas, mas não no de 12. No ensaio 2, os “pellets” não foram removidos, mas foi administrado naloxona (0,003-0,03 mg/kg, s.c.), objetivando antagonizar as ações da morfina, simulando uma retirada dessa droga (abstinência precipitada pela naloxona). A naloxona, de forma dose-dependente, precipitou a redução na exploração das vias abertas do “LEC”.

Esses achados sugerem que tanto a retirada espontânea como a precipitada, numa administração contínua de morfina, via implantação de “pellets”, resultam em efeitos ansiogênicos, plenamente demonstráveis no “LEC”.

Contrariando essas afirmações, Grasing et al. (1996), declaram que apesar do aumento da ansiedade ser o principal componente das síndromes de abstinência associadas com o etanol e as medicações hipnóticas/sedativas, as similaridades entre essas síndromes, bem como os dados implicando uma elevação na ação noradrenérgica na retirada de drogas opióides, esses autores investigaram as mudanças na avaliação da ansiedade, identificadas através da aplicação do “LEC” e do teste de interação social, utilizados durante a síndrome de abstinência opióide. Os ratos submeteram-se a uma contínua infusão de sulfato de morfina na dose de 44 mg/kg por dia, durante mais de sete dias, enquanto os animais controle receberam implantes inertes.

Durante os três primeiros dias de abstinência, o número de entradas e o tempo despendido sobre os braços abertos e fechados do "LEC" foram registrados. Tanto o comportamento social como o agressivo foram anotados, durante o pareamento dos grupos, visando a formação de dois animais sem experiência social anterior ("virgens"). Inicialmente foi observado que o peso corporal foi significativamente reduzido nos animais tratados com morfina, seja na circunstância prévia à abstinência ou no decorrer dela. Também notou-se que o número de ingressos e o tempo despendido nos braços abertos do "LEC" foi aumentado nos três dias de teste, em ambos grupos. No terceiro dia de abstinência, o tempo de interação social foi maior nos pares dos dois grupos. Portanto, os pesquisadores concluem que a mensuração do comportamento associado à ansiedade não foi aumentado durante a abstinência relacionada à opióides. Tejwani et al. (1997) relatam que anestésicos de curta-duração e drogas analgésicas, como o midazolam, podem produzir analgesia e reduzir a tolerância e a dependência, associada com a morfina, através de uma interação com o sistema opióide.

No intuito de investigar os efeitos do midazolam, da morfina e de ambos (conjuntamente), relativamente aos níveis de met-enkefalina esses pesquisadores utilizaram ratos Sprague-Dawley, divididos em quatro grupos distintos: (1) salina-salina; (2) salina-morfina; (3) midazolam-salina e (4) midazolam-morfina. Inicialmente, a administração de sol. salina ou de midazolam foi realizada via i.p., sendo que após 30 minutos, uma segunda injeção de sol. salina ou morfina era ministrada s.c., diariamente durante 11 dias.

Todos os animais foram sacrificados no 11^o dia, 60 minutos após a última injeção, para a mensuração de met-enkefalina, verificada através de radioimunoensaio. Os animais tolerantes à morfina, mostraram um significativo aumento nos níveis de met-enkefalina, no córtex (137%) e no mesencéfalo (89%) e uma redução, também significativa, na pituitária (74%), cerebelo (34%) e bulbo (72%).

Os ratos tratados com midazolam, exibiram uma redução significativa nos níveis de met-enkefalina, na pituitária (63%), córtex (39%), medula (58%), rins (36%), coração (36%) e adrenais (43%) e, um significativo aumento no striatum (54%) e ponte (51%). Quando a morfina e o midazolam foram injetados conjuntamente, o midazolam antagonizou a elevação dos níveis de met-enkefalina no córtex e na região do mesencéfalo e, da mesma forma, a diminuição desses níveis na região da medula, observada naqueles animais morfina-tolerantes. Esses resultados indicam que a tolerância e a dependência à morfina, está associada com mudanças na concentração de met-enkefalina no cérebro e, ainda, que o midazolam pode inibir este quadro, através da reversão de algumas dessas mudanças induzidas pelos níveis de met-enkefalina.

Em 1993, Brandão já asseverava que a síndrome de abstinência opióide compreende sintomas motivacionais e físicos correlatos. Em ratos a sintomatologia física tem sido caracterizada como uma intensa hiperatividade conjuntamente com saltitamento, ptose, trepidamento dos dentes, “tremores de cão molhado” e diarreia, enquanto que os sintomas motivacionais tem sido, muitas vezes, associado com o desenvolvimento de aversão a certos locais.

A pesquisa acerca dos substratos neurais dos sintomas motivacionais e físicos, da síndrome de abstinência opióide, não alcançam um consenso relativo a existência de bases neurais comuns ou separadas, responsáveis pela sua instalação. Este mesmo autor, coletou evidências de que a microinjeção de morfina na área cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG, ver p. 21 e abaixo), promove a inibição dos comportamentos defensivos. Entretanto, essas aplicações em altas doses, podem produzir uma hiperatividade “medrosa”, como aquela mensurada na arena circular ou originar efeitos ansiogênicos como aqueles avaliados no “LEC”. Os efeitos anti-aversivos da morfina, resultam da sua ação sobre os receptores *mu* e, aqueles aversivos podem estar associados com sua ação sobre outro receptor opióide. Esses achados, segundo Brandão (1993), implicam a PAG como uma importante estrutura do substrato neurobiológico dos sintomas emocionais e físicos da síndrome de abstinência opióide. Em outro trabalho de pesquisa, Motta e colaboradores, no mesmo ano (1993), enfatizam que a área cinzenta periaquedutal dorsal é uma região bem conhecida no processamento do comportamento defensivo no tronco cerebral. Esses investigadores utilizaram ratos canulados nessa área, que foram então submetidos ao elevado “LEC” por cinco minutos.

Os efeitos da morfina, via sistêmica (0,1-1,0 mg/kg) e via administração direta na DPAG (5-30 nmol), foram comparados com aqueles oriundos do midazolam, um composto benzodiazepínico, que foi injetado de maneira similar (1,0-10,0 mg/kg, i.p. e 10-80 nM, DPAG).

A morfina e o midazolam causaram, de modo dose-dependente, um aumento de ingressos e do tempo despendido sobre as ruelas abertas. Uma injeção sistêmica de naloxona em doses que bloqueiam o receptor *mu*-opióide, reverteu os efeitos da administração central de morfina, ao passo que altas doses de morfina (70 nmol) induziram uma hiperatividade “medrosa”, que não foi revertida pela naloxona. Estes fatos são sugestivos de que baixas doses de morfina inibem o substrato neural relacionado à aversão na DPAG, provavelmente através da ativação de *mu*-receptores e que a injeção de altas doses de morfina, causam ações pró-aversivas, que não são mediadas por estes receptores opióides.

Assim, dois anos depois (1995), Motta e colaboradores estudando ratos, afirmam existirem diversas evidências, que demonstram que os estados aversivos estão sob a influência de mecanismos opióides na DPAG e, visando caracterizar o subtipo de receptores envolvidos nesses efeitos, promoveram a administração diretamente nesta estrutura, de DAMGO e U50,488H, agonistas seletivos *mu* e *kappa*, respectivamente. Os animais implantados com chemitrode na DPAG foram submetidos ao elevado “LEC” e os efeitos de DAMGO (0,1-1,0 nmol/0,2 microlitros) e do U50,488H (1,0-10,0 nmol/0,2 microlitros) injetados diretamente na DPAG foram então avaliados. Baixas doses de DAMGO (0,1 e 0,3 nmol) causaram um aumento, de forma dose-dependente, no número de entradas nos braços abertos e também no tempo despendido sobre eles, enquanto um déficit integral na atividade exploratória foi observado com a dose mais alta (1,0 nmol).

Efeitos claramente aversivos foram verificados após a administração de U50,488H na DPAG. As ações anti-aversivas de 0,3 nmol de DAMGO, foram inibidas pela ministração intraperitoneal de naltrexona (2,0 mg/kg), um antagonista *mu*, ao passo que, os efeitos aversivos de 5,0 nmol de U50,488H, foram antagonizados pela nor-binaltorfimina (1,0 mg/kg, i.p.) um antagonista seletivo de receptor *kappa*. Estes resultados sugerem que a ativação de receptores *mu* inibem, enquanto que a dos receptores *kappa* aumentam o substrato neural associado com a aversão na PAG.

De acordo com Calenco Choukroun et al. (1991), o possível papel associado a heterogeneidade do receptor opióide, nas mudanças bifásicas relacionadas à locomoção (ativação e inibição), induzidas por opiáceos não-seletivos, como a morfina, tem sido investigados, através da avaliação do comportamento de ratos, expostos a diferentes meio-ambientes e, após administração na área tegmental ventral, de agonistas opióides *mu*-seletivos (DAGO) ou *delta*-seletivos (DTLET, DSTBULET, BUBU) e também de kelatorfan, um inibidor do metabolismo das encefalinas. Segundo os mesmos autores, um estado de hiperatividade foi induzido com drogas agonistas do receptor *delta* ou pelo kelatorfan, em um ambiente familiar (actímetro), em um meio-ambiente desconhecido ("holeboard") e em um meio que incutia medo (campo-aberto). Esses efeitos foram suprimidos pela naloxona e por antagonistas *delta*-seletivos (ICI 174, 864 2,0 mg/kg, s.c.; naltrindola 7,0 nmol administrada na área tegmental ventral). Além disso, os fármacos agonistas do subtipo de receptor *delta* e as encefalinas endógenas, "protegidas" pelo kelatorfan, não afetaram o estado emocional dos ratos, que foram avaliados no "LEC".

A infusão de DAGO na área tegmental ventral, também aumentou a atividade locomotora no actímetro, mas contrastando com os agonistas *delta* e o kelatorfan, esse agonista *mu* reduziu essa atividade no campo-aberto e no “holeboard”. Esta hipoatividade observada nestes testes, pode estar relacionada com um estado emocionalmente elevado, produzido pela estimulação do receptor *mu*, como demonstrado através da significativa redução no número de visitas e no tempo despendido nos braços abertos do “LEC”.

Em vez disso, Saldívar González e colaboradores (1997), avaliaram em ratos, o efeito da administração intraperitoneal de solução salina (2 ml/kg), através da utilização dos modelos relacionados a ansiedade, “LEC” e a postura defensiva de enterrar objetos (DB). Os animais foram testados em diferentes períodos de tempo, após a injeção i. p.: 1.5, 3, 5, 10, 15 e 30 minutos. Um efeito transiente da administração i.p. de sol. salina foi observado (i.e., aumento no DB nos animais testados 1.5 min. após a injeção) e uma diminuição nesse parâmetro foi verificada naqueles ratos que foram avaliados 3 min. depois da injeção. Não se encontrou nenhuma mudança no comportamento dos grupos de animais associados aos períodos de tempo de 5, 10, 15 e 30 min. Objetivando discriminar a suposta participação dos receptores vinculados aos peptídios opióides e/ou benzodiazepínicos, nas ações protagonizadas pela injeção i.p. salina, foram administrados flumazenil (5,0 mg/kg) e naloxona (1,0 mg/kg).

O aumento no DB em 1.5 min. foi mascarado pela administração desses dois compostos, tendo sido observado além disso, que o efeito foi bloqueado pela naloxona, mas não pelo flumazenil, enquanto que ambas substâncias reverteram a redução das respostas relacionadas ao DB nos animais testados 3 min. após a injeção. Nos ratos testados no "LEC", os resultados alcançados foram somente parciais.

Os autores, diante desses resultados conjecturam a participação de mecanismos referentes aos peptídios opióides endógenos nestas mudanças de comportamento.

2.7. ANSIEDADE E SUAS INTERAÇÕES COM O SISTEMA SEROTONINÉRGICO.

5-HIDROXITRIPTAMINA (5-HT) OU SEROTONINA.

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) foi originalmente descoberta em 1948, ano em que estava sendo pesquisada a identidade de uma substância vasoconstritora liberada quando se deixava o sangue coagular.

Inicialmente foi denominada serotonina, um nome ainda amplamente utilizado para denotar sua origem e sua ação biológica. Subseqüentemente, foi detectada na via gastrintestinal e no sistema nervoso central e demonstrou-se que a 5-HT tinha um importante papel como neurotransmissor, atuando também como hormônio local no sistema vascular periférico (Rang et al., 1997).

De todos os neurotransmissores conhecidos, a serotonina permanece historicamente como aquele mais intimamente envolvido com a neuropsicofarmacologia, estando estruturalmente relacionada com diversos agentes psicotrópicos. Quando a 5-HT foi primeiramente encontrada no sistema nervoso central de mamíferos, surgiu a teoria de que várias formas de enfermidades mentais podiam ser oriundas de anormalidades bioquímicas na sua síntese.

Atualmente, as alterações na função da 5-HT tem sido implicadas nas desordens afetivas, nos distúrbios obsessivos/compulsivos, na esquizofrenia, nos diferentes estados de ansiedade, nas alterações fóbicas, nas desordens associadas à ingestão, na enxaqueca e nos distúrbios do sono. De toda a 5-HT corporal, somente cerca de 1-2% encontra-se no cérebro. Não obstante, visto que a 5-HT não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), está evidente que as células cerebrais necessitam sintetizá-las (Cooper et al., 1996).

Para estas células, o primeiro passo importante é a captação do aminoácido triptofano, que é o substrato primário para a síntese de 5-HT. O triptofano plasmático origina-se da dieta, sendo que a sua eliminação desta, pode ocasionar níveis profundamente baixos de serotonina cerebral.

Além disso, um processo de captação ativo tem sido reconhecido, visando facilitar a entrada do triptofano no cérebro. Infelizmente neste processo, competem também uma ampla gama de aminoácidos, incluindo os aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina, outros aminoácidos como a leucina, isoleucina e valina e ainda metionina e histidina (Cooper et al., 1996). Desta forma, o conteúdo proteico da dieta pode influenciar especificamente os níveis de triptofano e 5-HT cerebrais através dos efeitos advindos do padrão de aminoácidos plasmáticos. De mais a mais, a variação rítmica diária na concentração do triptofano sérico, pode também exercer profunda influência na taxa de síntese da serotonina cerebral (Cooper et al., 1996).

O segundo passo nesta síntese (ver mais adiante) é representado pela hidroxilação do triptofano na posição 5, formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP). A enzima responsável por esta reação, a triptofano-hidroxilase, ocorre em baixas concentrações na maioria dos tecidos, incluindo o cérebro, sendo portanto, muito difícil seu isolamento para a realização de estudos (Cooper et al., 1996).

As maiores concentrações de 5-HT ocorrem em três situações no organismo:

Na parede do intestino. Cerca de 90% da quantidade total de 5-HT no corpo encontram-se nas células enterocromafins, que são células derivadas da crista neural, semelhantes àquelas da medula supra-renal, que se imiscuem às células da mucosa, principalmente no estômago e no intestino delgado. Alguma quantidade de 5-HT também é encontrada nas células nervosas do plexo mioentérico, e existem boas evidências de que a substância atua nesse local como um neurotransmissor excitatório (Rang et al., 1997).

No sangue. A 5-HT está presente em concentrações elevadas nas plaquetas, que acumulam, a partir do plasma, por meio de um sistema de transporte ativo, liberando-a quando se agregam a regiões de lesão tecidual (Rang et al., 1997).

No sistema nervoso central. A 5-HT é um transmissor no sistema nervoso central e encontra-se presente em altas concentrações em regiões localizadas no mesencéfalo (Rang et al., 1997).

As ações da 5-HT são numerosas e complexas, evidenciando-se uma considerável variação entre as espécies. As principais e aquelas que encontram-se estreitamente associadas aos distúrbios da ansiedade são descritas a seguir:

Via gastrintestinal. A 5-HT gera um aumento da motilidade gastrintestinal e da contração de faixas isoladas de intestino. Isto é devido, em parte, a um efeito direto sobre as células musculares lisas e, em parte, a um efeito excitatório indireto sobre os neurônios entéricos. O reflexo peristáltico, induzido por um aumento da pressão dentro do segmento do intestino, é, pelo menos parcialmente, mediado pela liberação de 5-HT a partir das células cromafins como resposta ao estímulo mecânico. As células cromafins também respondem à estimulação vagal com liberação de 5-HT (Rang et al., 1997).

A musculatura lisa em outros locais do corpo (por exemplo, útero e árvore brônquica) também se contrai como resposta à 5-HT em muitas espécies, mas a extensão desse efeito no homem é pequena (Rang et al., 1997).

Vasos sangüíneos. Diversos efeitos são produzidos sobre os vasos sangüíneos, e o efeito global varia segundo as dimensões do vaso e a atividade simpática prevalente.

Os grandes vasos, tanto arteriais quanto venosos, costumam sofrer constrição pela ação da 5-HT, apesar de suas sensibilidades variarem enormemente. A constrição corresponde a uma ação direta sobre as células musculares lisas vasculares mediada pelos receptores 5-HT_{2A}. A 5-HT pode gerar também vasodilatação por diversos mecanismos, todos os quais operam por intermédio de receptores 5-HT₁: (1) por atuação sobre as células endoteliais no sentido da liberação de óxido nítrico, que relaxa a musculatura lisa; (2) por inibição da liberação de noradrenalina a partir das terminações nervosas simpáticas; (3) possivelmente, por intermédio de um efeito relaxante direto sobre as células musculares lisas (Rang et al., 1997).

Assim, os receptores 5-HT₂ geram predominantemente vasoconstrição, ao passo que os receptores 5-HT₁ produzem dilatação. Quando os receptores 5-HT₂ são bloqueados pela cetanserina, manifesta-se o efeito vasodilatador (Rang et al., 1997).

Na microcirculação, a 5-HT causa dilatação das arteríolas e constrição das vênulas, resultando isto em uma elevação da pressão capilar e em extravasamento de líquidos dos capilares. A serotonina apresenta também um efeito direto sobre os capilares, tornando-os mais permeáveis às proteínas e estimulando assim a formação de líquido tecidual (Rang et al., 1997).

Quando a 5-HT é injetada por via intravenosa, costuma ocorrer uma elevação inicial da pressão arterial secundária à constrição dos grandes vasos. Em seguida, a pressão arterial cai devido à dilatação arteriolar e à perda da volemia (Rang et al., 1997).

Plaquetas. A 5-HT gera agregação plaquetária, e as plaquetas que ficam retidas no vaso liberam mais 5-HT. Em presença de um endotélio íntegro, a liberação de serotonina das plaquetas aderidas causa vasodilatação, ajudando assim a manter o fluxo sanguíneo. Se o endotélio estiver lesado (por exemplo, por aterosclerose), a 5-HT gera constrição e prejudica ainda mais o fluxo sanguíneo. Acredita-se que esses efeitos da 5-HT derivada das plaquetas tenham alguma importância nas doenças vasculares (Rang et al., 1997).

Terminações nervosas. A 5-HT estimula as terminações nervosas sensitivas nociceptivas (mediadoras da dor). Quando injetada na pele, causa dor e, por via sistêmica, desencadeia diversos reflexos autônomos, pela estimulação de fibras aferentes para o coração e pulmões, que complicam ainda mais a resposta cardiovascular. Picadas de vespas contém, entre outras substâncias, serotonina (Rang et al., 1997).

Sistema nervoso central. A 5-HT excita alguns neurônios e inibe outros, podendo também atuar pré-sinápticamente na inibição da liberação de transmissor pelas terminações nervosas. Diferentes tipos de receptor e mecanismos de membrana medeiam esses efeitos (Bobker et al., 1990). O papel da 5-HT no sistema nervoso central é discutido abaixo.

O interesse na 5-HT como um possível transmissor do sistema nervoso central data de 1953, quando Gaddum (apud Rang et al., 1997) descobriu que a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), uma droga conhecida como sendo um alucinógeno poderoso, agia como antagonista da 5-HT nos tecidos periféricos, e sugeriu que seus efeitos centrais poderiam também estar relacionados a esta ação.

A presença de serotonina no cérebro foi demonstrada alguns anos mais tarde. Muito embora o cérebro seja responsável por apenas cerca de 1% do total de conteúdo corporal da 5-HT, este neurotransmissor ocupa uma posição fundamental na hegemonia neuroquímica (Green, 1985; Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997).

A formação, o armazenamento e a liberação de 5-HT são muito similares àqueles da noradrenalina. Como já foi mencionado anteriormente, a substância precursora é o triptofano, um aminoácido derivado de proteínas da dieta, cujo conteúdo plasmático varia consideravelmente de acordo com a ingestão de alimentos e momento do dia.

O triptofano é captado pelos neurônios por um processo de transporte ativo, convertido pela triptofano-hidroxilase em 5-hidroxitriptofano (nas células cromafins e nos neurônios, porém não nas plaquetas) e, em seguida, descarboxilado por uma aminoácido descarboxilase inespecífica (que atua sobre muitos outros substratos e que também está envolvida na síntese de catecolaminas e de histamina) em 5-HT (Rang et al., 1997).

A triptofano-hidroxilase pode ser seletiva e irreversivelmente inibida pela p-clorofenilalanina (PCPA).

A disponibilidade do triptofano e a atividade da triptofano-hidroxilase [na inibição desta enzima, 80% do conteúdo de serotonina cerebral rapidamente é reduzido (Cooper et al., 1996)] são consideradas como os principais processos que regulam a síntese de 5-HT (Rang et al., 1997). A 5-HT-descarboxilase é muito semelhante, se não idêntica, à DOPA-descarboxilase, e não parece desempenhar qualquer papel na regulação da síntese (Rang et al., 1997) de 5-HT [quando a 5-HT-descarboxilase é inibida não há efeito nenhum sobre o nível cerebral de 5-HT (Cooper et al., 1996)]. Desde que esse passo também depende do oxigênio molecular, a taxa de formação de 5-HT pode ser influenciada pelo nível tecidual de oxigênio. Possui igualmente interesse, o fato de que a 5-hidroxitriptofano não é inibida pela atividade da triptofano-hidroxilase. Se a situação da serotonina fosse similar ao que já foi descrito para as catecolaminas, poderia-se esperar que a concentração de 5-HT exerceria influências sobre a atividade na fase de hidroxilação. Entretanto, quando o catabolismo da 5-HT é bloqueado por inibidores da monoamina oxidase, a concentração cerebral de serotonina acumula-se linearmente à níveis três vezes mais elevados do que dos animais controle, sugerindo assim, que a inibição do produto final pela serotonina não tem importância. Semelhantemente, se o efluxo de ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA) do cérebro é bloqueado pela probenecida (que parece bloquear todas as formas de transporte), os níveis de 5-HIAA também continuam em ascensão linear por prolongados períodos de tempo, sugerindo novamente que o passo inicial da síntese não é afetado pelos níveis de nenhum dos subseqüentes metabólitos.

Conseqüentemente, duas possibilidades permanecem em aberto: o grau de síntese inicial pode ser limitado unicamente pela disponibilidade dos co-fatores requeridos ou dos substratos, como o oxigênio, pteridina e triptofano; ou devido a outras características de controle mais sutis, estreitamente associadas com a atividade cerebral. Evidências tem sido acumuladas formando a proposta de que o impulso do fluxo pode, como ocorre no sistema catecolinérgico, iniciar mudanças nas propriedades físicas da taxa-limite da triptofano-hidroxilase. Adicionalmente, diversos mecanismos tem sido postulados para a regulação fisiológica da triptofano-hidroxilase induzidos por alterações na atividade neuronal dos neurônios serotoninérgicos. A grande maioria das evidências, atualmente suportam o envolvimento da fosforilação cálcio-dependente, nestes processos regulatórios (Cooper et al., 1996).

A clonagem da DOPA-descarboxilase finalmente providenciou uma prova definitiva de que uma única enzima cataliza a descarboxilação da L-DOPA nos neurônios catecolaminérgicos e da L-5-HTP nos neurônios serotoninérgicos (Cooper et al., 1996).

Após a liberação, a 5-HT é amplamente recuperada pela captação neuronal, sendo este mecanismo inibido por muitas das mesmas drogas (por exemplo, anti-depressivos tricíclicos) que inibem a captação de catecolaminas. O transportador não é idêntico, contudo, e os inibidores mostram alguma especificidade entre os dois sistemas (Rang et al., 1997).

Como ocorre com os neurônios catecolaminérgicos, a recaptação representa o principal mecanismo que determina o fim da ação da serotonina a nível sináptico. Recentemente, a clonagem de transportadores de monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) e a verificação de que pertencem a uma ampla família de genes que carregam outros neurotransmissores, incluindo GABA e glicina, demonstrou que a expressão destes carreadores em células não neuronais tem estabelecido um modelo extremamente útil na análise estrutural relacionada a especificidade dos transmissores e seus antagonistas (Cooper et al., 1996).

Trabalhos recentes demonstraram que a 5-HT costuma ser armazenada (nos neurônios e nas células cromafins) juntamente com diversos hormônios peptídicos, como a somatostatina, a substância P ou o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), e foi sugerido que a co-transmissão possa ter importância fisiológica. A 5-HT é degradada quase totalmente pela MAO (monoamina oxidase), que a converte a 5-hidróxi-indol acetaldeído, a maior parte do qual é hidrogenada para formar ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA), que é excretado na urina e atua como um indicador da produção de 5-HT do organismo (Cooper et al., 1996, Rang et al., 1997). A 5-hidróxi-indol acetaldeído também pode ser reduzida a 5-hidroxitriptofol, dependendo da proporção de NAD^+ / $NADH$ no tecido (Cooper et al., 1996). Parte da 5-HT é convertida em 5-metoxitriptamina por metilação do grupamento $-OH$ do anel, e essa reação é exatamente análoga à formação da normetanefrina a partir da noradrenalina. A 5-metoxitriptamina tem ações cerebrais por si mesma e é possível que esteja envolvida em alguns distúrbios afetivos (Rang et al., 1997).

O mapeamento de neurônios que contém 5-HT foi realizado através de técnicas similares às utilizadas para neurônios noradrenérgicos, isto é, histoquímica por fluorescência, marcação imunofluorescente de enzimas específicas (triptofano-hidroxilase) e a observação de marcadores específicos que são captados pelos terminais nervosos ou corpos celulares e transportados para outras partes dos neurônios (Rang et al., 1997).

A distribuição dos neurônios que contém 5-HT é muito similar àquela dos neurônios noradrenérgicos e bastante diferente daquela dos neurônios que contém dopamina. As células ocorrem em vários grupamentos grandes na ponte e parte superior do bulbo, situados próximo à linha média (rafe) e freqüentemente mencionados como núcleos da rafe. Os núcleos situados rostralmente [rafe dorsalis, rafe medianus e centralis superior ou B₇-B₉ (Cooper et al., 1996)] projetam-se através do feixe mediano do prosencéfalo e também contêm muitas fibras noradrenérgicas difusamente para muitas partes do córtex, hipocampo, sistema límbico e hipotálamo, sendo a organização completa muito similar àquela do sistema noradrenérgico (Rang et al., 1997).

As células situadas caudalmente projetam-se para a medula espinhal (Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997). Além disso, afora os nove núcleos associados com a 5-HT (B₁-B₉), originalmente descritos por Dahlström e Fuxe (apud Cooper et al., 1996), recentemente o emprego de técnicas de imunocitoquímica mostrou que a 5-HT também encontra-se detectável em células reativas na área postrema [(zona deflagradora quimiorreceptora), uma região do bulbo onde os estímulos químicos de muitos tipos podem dar início ao vômito (Rang et al., 1997)] e no locus ceruleus caudal, bem como ao redor do núcleo

interpeduncular (Cooper et al., 1996). Esses estudos imunocitoquímicos também revelaram uma profunda e mais extensa inervação do córtex cerebral, que, distintamente das fibras corticais noradrenérgicas, são de maneira geral, completamente padronizadas. Em parte, estas análises poderiam gerar desapontamento, visto que a maioria dos neurônios da rafe parece que inervam áreas terminais, sendo assim mais semelhantes à NA do que com a dopamina. Exceções desta generalização são representadas pelo grupo B₈ (rafe medianus) que provavelmente fornecem ampla inervação serotoninérgica para o sistema límbico, enquanto que o núcleo B₇ (rafe dorsal) projeta alta densidade para o neostriatum, córtex cerebral e cerebelar e tálamo (Cooper et al., 1996).

Tem sido reconhecido que o córtex cerebral de muitos mamíferos é inervado por dois tipos morfológicamente distintos de axônios terminais 5-HTérgicos. Axônios delgados contendo pequenas varicosidades e originários do núcleo dorsal da rafe, e axônios ornados com grandes varicosidades esféricas, oriundos do núcleo mediano da rafe. Estes dois tipos de axônios serotoninérgicos possuem distribuição regional e laminar diferenciadas e parece que apresentam sensibilidade distinta, diante dos efeitos neurotóxicos induzidos por certos derivados de anfetaminas, incluindo a 3,4-metilenedioximetamfetamina (MDMA), referida mais comumente como “ectasy” (Cooper et al., 1996).

Assim, os axônios finos são muito mais sensíveis à esses efeitos neurotóxicos, do que os outros e, se uma injúria, deste tipo, nos primeiros perdurar por alguns meses, pode se tornar permanente (Cooper et al., 1996).

Muitos estudos sobre os efeitos da 5-HT e compostos relacionados nos neurônios individuais demonstraram que ela pode interagir com vários tipos de receptor e produzir vários tipos de resposta celular (Peroutka, 1988).

A localização precisa dos neurônios 5-HT no tronco cerebral permitiu que sua atividade elétrica fosse estudada em detalhes, e correlacionada com efeitos comportamentais e outros efeitos produzidos por drogas que afetam a transmissão mediada pela 5-HT (Rang et al., 1997).

As células de 5-HT mostram um padrão de descarga lenta, incomum, altamente regular, e são fortemente inibidas por agonistas do receptor 5-HT₁, sugerindo um mecanismo de retroalimentação inibitória local (Rang et al., 1997).

Em vertebrados, determinadas funções fisiológicas e comportamentais relacionam-se particularmente com as vias de 5-HT, a saber (Rang et al., 1997):

Alucinações e alterações comportamentais,

Sono, vigília e humor,

Controle da transmissão sensorial.

Muitos análogos da 5-HT de ação central (por exemplo, LSD) são alucinógenos (Green, 1985) e deprimem a deflagração dos neurônios de 5-HT. Estes neurônios exercem uma influência inibitória sobre os neurônios corticais, tendo sido sugerido que a perda da inibição cortical resultante da supressão da atividade desses neurônios fundamenta o efeito alucinogênico, bem como determinados efeitos comportamentais em animais de experiência, como os "tremores de cão molhado" que ocorrem em ratos quando o precursor de 5-HT, o 5-HTP é administrado (Green, 1985).

As lesões dos núcleos da rafe, ou a depleção de 5-HT pela administração de PCPA abolem o sono em animais de experimentação, enquanto a microinjeção de 5-HT em pontos específicos no tronco cerebral induz o sono. Tentativas de curar a insônia no homem fornecendo precursores de 5-HT (triptofano ou 5-hidroxitriptofano), contudo, não foram bem-sucedidas. Existem evidências de que a 5-HT, assim como a noradrenalina, pode estar envolvida no controle do humor, e o uso de triptofano para aumentar a síntese de 5-HT tem sido tentado na depressão, com resultados duvidosos (Rang et al., 1997).

Após lesões nos núcleos da rafe ou administração de PCPA, os animais mostram respostas exageradas a muitas formas de estímulos sensitivos. Eles são assustados muito mais facilmente, e também desenvolvem rapidamente respostas de anulação para estímulos que normalmente não produziram este efeito. Parece que a capacidade normal para desconsiderar formas irrelevantes de impulso sensitivo requer vias de 5-HT intactas. A “exacerbação sensitiva” produzida pelas drogas alucinogênicas pode ser parcialmente devida ao antagonismo da 5-HT. A 5-HT também exerce um efeito inibitório na transmissão nas vias da dor, tanto na medula espinhal quanto no cérebro, e existe um efeito sinérgico entre a 5-HT e analgésicos como a morfina. Assim, a depleção de 5-HT pelo PCPA, ou lesões seletivas aos neurônios que contêm 5-HT e seguem para o corno dorsal, antagonizam o efeito analgésico da morfina, enquanto inibidores da captação de 5-HT apresentam o efeito oposto. A 5-HT é também considerada como um transmissor inibitório na retina (Rang et al., 1997).

Esses efeitos na nocicepção e função retiniana podem ser aspectos do efeito inibitório mais geral da 5-HT no impulso sensitivo. A correlação desses fenômenos comportamentais com subtipos específicos de receptor ainda não foi esclarecida (Rang et al., 1997).

Os neurônios 5-HT do núcleo da rafe no tronco cerebral exibem atividade monotônica espontânea, descarregadas como um relógio, com uma frequência intrínseca de uma a cinco por segundo. Nos roedores essas propriedades monotônicas são manifestadas precocemente durante o desenvolvimento (3-4 dias antes do nascimento). Os neurônios serotoninérgicos parecem possuir um mecanismo de feedback negativo que limitam essa atividade neuronal e, como a ação fisiológica dos neurônios 5-HT aumentam, no local de liberação de 5-HT nos dendritos ou axônios colaterais, atuando sobre autorreceptores de 5-HT somatodendríticos acaba ocorrendo uma inibição desta atividade neural. Este mecanismo auto-regulador provavelmente ocorre somente em condições fisiológicas e pode tornar-se inoperante durante os períodos de baixo nível de atividade, porém pode ressurgir funcionalmente diante de um aumento da atividade neuronal.

Disfunções neste mecanismo auto-regulador tem sido implicadas em várias formas de neuropatologias humanas. Assim, devido às projeções extraordinariamente difundidas e um padrão de marca-passo altamente regulado de atividade, que é característico de neurônios serotoninérgicos, uma função homeostática ampla foi sugerida para o sistema da 5-HT (Cooper et al., 1996).

Exercendo efeitos modulatórios simultâneos sobre a excitabilidade neuronal em diversas regiões cerebrais e da medula espinhal, o sistema serotoninérgico tem uma posição estratégica na coordenação dos complexos padrões, tanto sensoriais como motores, durante uma grande variedade de estados comportamentais (Cooper et al., 1996).

O marca-passo intrínscico do sistema 5-HTérgico é modulado, no mínimo por dois neurotransmissores: (1) noradrenalina, que atua nos receptores adrenérgicos, acelerando o marca-passo; e (2) 5-HT atuando nos autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, diminuindo a atividade do marca-passo. No hipocampo, outra estrutura anatômica que contém uma alta densidade de sítios 5-HT_{1A}, os agonistas 5-HT_{1A} hiperpolarizam as células piramidais em CA₁, através da abertura dos canais de potássio, via proteína G toxina-pertussis-sensível (Cooper et al., 1996).

Registros eletrofisiológicos dos neurônios serotoninérgicos realizados em animais não-anestesiados mostram que a atividade da 5-HT encontra-se alta durante os períodos de vigília atenta, reduzida na vigília sem atenção, mais reduzida ainda durante o sono de ondas lentas e ausente durante o sono REM ("rapid-eye-movement"). Um aumento na atividade tônica dos neurônios serotoninérgicos durante o estado de vigília atenta, pode determinar uma elevação na excitabilidade dos neurônios motores, via projeções descendentes para o corno ventral da medula espinhal. Uma supressão na entrada sensitiva (ascendente), reciprocamente, serviria para filtrar sugestões sensoriais.

A cessação da atividade neuronal serotoninérgica durante o sono REM, tende a impedir a função motora neste estado paradoxal, no qual a vigília interna esta associada com a diminuição motora.

Alterações funcionais do sistema 5-HTérgico tem sido relatadas em diversas condições psicopatológicas, incluindo distúrbios afetivos, estados de hiper-agressividade e esquizofrenia. Existem evidências de que as perturbações da função serotoninérgica são as principais causas da depressão e do comportamento suicida. Neste contexto, é interessante observar que diversas drogas efetivamente anti-depressivas parecem atuar aumentando a transmissão serotoninérgica (Cooper et al., 1996).

Outras funções em que a 5-HT tem sido implicada incluem o controle da ingestão de alimentos e várias funções autônomas e endócrinas, como a regulação da temperatura corporal, pressão sangüínea e função sexual (Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997).

Considera-se que a 5-HT está envolvida em muitos processos fisiológicos muito importantes, e existe claramente possibilidade para novas drogas que influenciam a transmissão 5-HTérgica de maneira seletiva. Essas drogas agora estão se tornando disponíveis: por exemplo, os antidepressivos que agem pelo bloqueio da recaptção de 5-HT; a buspirona, um agonista do receptor 5-HT_{1A}, é eficaz no tratamento da ansiedade; antagonistas do receptor 5-HT₃, como o ondansetron, que são utilizados principalmente como agentes antieméticos, são ativos em modelos animais de ansiedade, podendo ser clinicamente úteis neste contexto (Cutler et al., 1997; Rang et al., 1997; Rodgers et al., 1997a).

RECEPTORES DE 5-HT.

Há muito tempo percebeu-se que as várias ações da 5-HT não são mediadas por receptores do mesmo tipo, e isto engendrou várias classificações farmacológicas que vieram e se foram. A seqüência de aminoácidos de muitos subtipos de receptor da 5-HT foi definida por clonagem (Hartig, 1989; Zifa et al., 1992) e coletou-se uma quantidade considerável de informações sobre os mecanismos de transdução aos quais esses receptores se acoplam.

Recentemente, um encontro de cúpula de especialistas da 5-HT sintetizou os conhecimentos atuais da farmacologia, dos mecanismos de transdução e dos estudos de clonagem e liberou, a última versão da classificação (Humphrey et al., 1993). Esta reconhece quatro tipos principais de receptor, 5-HT₁₋₄, com subdivisões dos tipos 1 e 2.

Os receptores 5-HT₁ ocorrem principalmente no encéfalo, e os subtipos são distinguidos com base em sua distribuição regional e especificidade farmacológica.

Seus efeitos neuronais são predominantemente inibitórios (exercidos tanto antes quanto após a sinápsis). Os receptores 5-HT₁ são acoplados à proteína G (tipo 2) ligados à inibição da adenilato-ciclase. O subtipo 5-HT_{1A} é especialmente importante no cérebro e tem relação com o humor e o comportamento (Rodgers et al., 1997b). O subtipo 5-HT_{1D}, expresso nos vasos sanguíneos cerebrais, é tido como importante na enxaqueca e corresponde ao alvo de uma droga recentemente introduzida para o combate da enxaqueca (o sumatriptano).

Esses vasos são incomuns pelo fato de a vasoconstrição ser mediada por receptores 5-HT₁; na maioria dos vasos, os responsáveis pela vasoconstrição são os receptores 5-HT₂. O receptor 5-HT_{1C} – na verdade, o primeiro a ser clonado – foi agora oficialmente declarado inexistente, tendo sido vergonhosamente reclassificado como receptor 5-HT_{2C} quando foi constatada a sua relação com a produção de InsP₃ (inositol(1,4,5)-trifosfato), mas não com a adenilato-ciclase (Rang et al., 1997). Estudos eletrofisiológicos realizados em oócitos de *Xenopus*, que expressam receptor 5-HT_{1C}, revelaram que a aplicação de 5-HT causa um fluxo interno detectável que é bloqueado pela mianserina.

A ativação do receptor 5-HT_{1C}, aparentemente libera fosfato de inositol, elevando os níveis de Ca²⁺ intracelular e conduzindo à abertura dos canais de cloreto Ca²⁺-dependentes (Cooper et al., 1996).

Os receptores 5-HT₂ são mais importantes na periferia do que no sistema nervoso central. Os efeitos da 5-HT sobre a musculatura lisa e as plaquetas, conhecidos há vários anos, são mediados pelo receptor 5-HT_{2A}, da mesma forma que alguns efeitos comportamentais de agentes como a dietilamida do ácido lisérgico, o LSD. Os receptores 5-HT₂ são vinculados à fosfolipase C, que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol; os agonistas do 5-HT₂, assim, estimulam a formação de InsP₃. O subtipo 5-HT_{2A} é o mais importante em termos funcionais, e os demais apresentam uma distribuição e um papel funcional muito mais limitados. O papel dos receptores 5-HT₂ em processos fisiológicos normais provavelmente é pequeno, mas ganha destaque em afecções patológicas como a asma e a trombose vascular (Rang et al., 1997).

Nos mamíferos, dois efeitos neurofisiológicos específicos tem sido atribuídos à ativação do receptor 5-HT₂. A serotonina facilita as ações excitatórias do glutamato no núcleo motor facial, um efeito que é contraposto pelos antagonistas 5-HT₂. Dados similares foram obtidos com estudos intracelulares, que demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT acarretava uma lenta despolarização dos neurônios motores do nervo facial e aumentava a resistência de entrada, conduzindo a uma elevação da excitabilidade da célula, provavelmente por diminuição na condutância do potássio. Estes resultados sugerem que os receptores 5-HT₂ modulam a excitação dos neurônios motores faciais, induzida pela 5-HT.

É também amplamente reconhecido que a serotonina determina uma vagarosa despolarização dos neurônios corticais, que é associada com a redução da condutância. Este efeito pode ser dessensibilizado pela repetida aplicação de 5-HT e bloqueado pelo antagonista seletivo de 5-HT₂, a ritanserina. Desta maneira, as ações da serotonina sobre os neurônios piramidais corticais, compartilha muitas semelhanças com os efeitos da despolarização observadas no núcleo motor facial e aparentemente também é mediada pelos receptores 5-HT₂ (Cooper et al., 1996).

Os receptores 5-HT₃ ocorrem principalmente no sistema nervoso periférico (SNP), sobretudo em neurônios sensitivos nociceptivos, e em neurônios autônomos e entéricos, sobre os quais a 5-HT exerce fortes efeitos excitatórios. A 5-HT propriamente dita, desencadeia dor no local em que é injetada e, quando administrada por via intravenosa, gera uma fina exibição de reflexos autônomos,

que resulta da excitação de muitos tipos de fibras nervosas sensitivas vasculares, pulmonares e cardíacas (Rang et al., 1997).

O papel fisiológico desse receptor é desconhecido, mas foi postulado que a excitação de terminações nervosas sensitivas vasculares pela 5-HT liberada das plaquetas possa estar envolvida na patogenia da enxaqueca. O aspecto excepcional dos receptores 5-HT₃ é o fato de estarem diretamente ligados aos canais iônicos de membrana (receptores do tipo 1) e de não envolverem segundos mensageiros em seu mecanismo de transdução (Rang et al., 1997).

Ocorrem também receptores 5-HT₃ no SNC, onde são encontrados em altas densidades no córtex entorinal e área postrema. Recentes experimentos demonstraram que a liberação de dopamina endógena, pela estimulação dos receptores 5-HT₃ no striatum, sucede de forma cálcio-dependente (Cooper et al., 1996).

Embora a função fisiológica dos receptores 5-HT₃ no SNC não esteja totalmente esclarecida, a observação de que antagonistas seletivos deste receptor, possuem atividade central em ratos e primatas em modelos comportamentais ansiolíticos e anti-dopaminérgicos, tem gerado considerável excitação e especulação acerca do potencial uso terapêutico de antagonistas e agonistas de 5-HT₃ (Cooper et al., 1996). Sabe-se atualmente que os agentes bloqueadores desses receptores tem um efeito ansiolítico (Rang et al., 1997).

Recentemente, os receptores 5-HT₄ foram identificados como uma subclasse distinta de receptores 5-HT₃. Seu principal papel fisiológico parece ocorrer na via gastrintestinal, onde medeiam o efeito da 5-HT na estimulação da peristalse; apesar disso, ocorrem também no sistema nervoso central (Rang et al., 1997).

Cooper et al. (1996) classifica 15 tipos distintos de receptores de 5-HT, que foram clonados dos tecidos de mamíferos. Desta forma, segundo o mesmo autor, a maioria dos receptores serotoninérgicos pertencem a grande família de receptores acoplados à proteína G, exceto o receptor 5-HT₃ que é ligado à canais iônicos (ver acima). Os receptores do primeiro grupo (acoplados a proteína G) podem ainda ser divididos em diferentes famílias, baseados nas suas ligações com segundos mensageiros e sequência de aminoácidos.

Como já foi mencionado, a família de receptores 5-HT₁ são acopladas negativamente à adenilato-ciclase, enquanto que a família 5-HT₂ contém três receptores que possuem surpreendentemente homologia na sequência de aminoácidos e o mesmo tipo de ligação com segundo mensageiro, i.e., ativação da fosfolipase C. Os receptores 5-HT que são positivamente acoplados à adenilato-ciclase formam um grupo heterogêneo, que inclui os subtipos 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇.

O grupo 5-HT₅ alberga dois receptores, 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B} e representam uma nova família de receptores serotoninérgicos que não são similares às famílias 5-HT₁ e 5-HT₂, em termos de sequência de aminoácidos, perfil farmacológico e sistema de transdução (eles são provavelmente acoplados à diferentes sistemas efetores).

Em contraste com os receptores 5-HT ligados a proteína G, que modulam as atividades celulares via um sistema de segundo mensageiro, os receptores 5-HT₃ ativam diretamente o canal catiônico, que rapidamente e transitoriamente despolarizam uma grande variedade de neurônios (outros membros desta família de receptores incluem o GABA, o glutamato, a glicina e o receptor nicotínico da acetilcolina).

Resumidamente, aceita-se hoje que: (1) os efeitos inibitórios da 5-HT são mediados por receptores 5-HT₁ ligados com a abertura dos canais de K⁺ ou ao fechamento dos canais de Ca²⁺, ambos via proteína G toxina pertussis sensíveis; (2) os efeitos de facilitação da 5-HT são mediados por receptores 5-HT₂ e envolvem o fechamento dos canais de K⁺, que parecem ser modulados através de um sistema de segundos mensageiros PI e PKC, que atuam como um feedback negativo; (3) outros efeitos facilitatórios da 5-HT parecem ser mediados por receptores 5-HT₄ e 5-HT₇ através da redução em certas correntes voltagem-dependentes de K⁺, moduladas pela fosforilação da proteína quinase A, desta forma, envolvendo um acoplamento positivo da resposta da 5-HT com a adenilato-ciclase; (4) as intensas excitações são mediadas pelos receptores 5-HT₃ através da ligação com canais catiônicos, que não requerem o acoplamento com a proteína G ou um segundo mensageiro. Portanto, está claro que as ações eletrofisiológicas da 5-HT estão associadas à duas principais superfamílias de genes relacionados aos neurotransmissores – àqueles receptores acoplados à proteína G e àqueles ligados aos canais catiônicos. Os efeitos finais são determinados pelo subtipo de receptor e pela sua localização anatômica (Cooper et al., 1996).

DROGAS QUE AFETAM A TRANSMISSÃO MEDIADA POR 5-HT.

Muitos compostos têm tido utilidade como instrumentos experimentais para a definição de subtipos de receptores; algumas das substâncias mais modernas, como os antagonistas da 5-HT₃ ondansetron, tropisetron e granisetron e o antagonista 5-HT_{1D} sumatriptano são atualmente utilizados como agentes terapêuticos (Cutler et al., 1997; Rang et al., 1997; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b);

acredita-se que apenas algumas das drogas consagradas (por exemplo, ciproheptadina) atuem principalmente sobre os receptores 5-HT. Entretanto, está claro que muitas drogas antidepressivas atuam parcialmente por afetarem o metabolismo ou a liberação da 5-HT, bem como por intermédio de suas ações sobre a transmissão noradrenérgica. Como seria esperado, existe uma grande superposição entre os efeitos medicamentosos dos dois sistemas em termos de metabolismo do transmissor e interações com os receptores, uma vez que já foi demonstrada uma considerável homologia de seqüências entre os adrenorreceptores e os receptores da 5-HT (Rang et al., 1997; Rodgers et al., 1997b).

A espiperona, por exemplo, apesar de seletiva para um dos tipos de receptor de 5-HT, é um potente antagonista da dopamina e da noradrenalina e a melhor forma de classificá-la seria como uma droga neuroléptica (Rang et al., 1997). Além disso, existem uma vasta série de drogas psicotrópicas que afetam a neurotransmissão da 5-HT, incluindo antidepressivos (bloqueadores seletivos da captação de 5-HT, e.g., fluoxetina); alucinógenos (e.g., LSD, psilocina); ansiolíticos (e.g., buspirona); antipsicóticos atípicos (e.g., clozapina); antieméticos (e.g., ondansetron); anorexígenos (e.g., fenfluramina) e drogas anti-enxaquecas (e.g., sumatriptano) (Cooper et al., 1996).

O sumatriptano é usado para o tratamento da enxaqueca. Os antagonistas seletivos para 5-HT_{1A}, como o 8-OH-DPAT [8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina], são potentes agentes hipotensores que atuam por um mecanismo central e podem vir a comprovar sua utilidade nesse contexto (Rang et al., 1997; Rodgers et al., 1997b).

A metoclopramida, uma droga não-seletiva que atua sobre a dopamina e sobre os receptores 5-HT, é clinicamente utilizada como um agente antiemético. Atua principalmente como um agonista dos receptores de 5-HT₄, aumentando a peristalse gástrica, facilitando o esvaziamento gástrico e inibindo o estímulo ao vômito (Rang et al., 1997).

Os antagonistas "clássicos" da 5-HT constituem um grupo que sabidamente atua sobre os receptores 5-HT₂. Incluem a metisergida, a cipro-heptadina e a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) (Rang et al., 1997). A cetanserina é um composto mais moderno desse tipo, que bloqueia também os receptores α -

adrenérgicos e os recptores H₁ da histamina (Cooper et al., 1996). Essas drogas podem ter utilidade no tratamento de distúrbios vasoespásticos, como a doença de Raynaud, mas seu emprego ainda é controvertido. A cetanserina é eficaz na redução da pressão arterial, mas não se sabe ao certo se esse efeito resulta de uma ação bloqueadora dos receptores de 5-HT ou de efeitos sobre os receptores α -adrenérgicos (Rang et al., 1997). O uso dessas drogas na enxaqueca é discutido adiante.

Recentemente foram desenvolvidos antagonistas seletivos e potentes dos receptores 5-HT₃ [por exemplo, ondansetron, tropisetron (Fozard, 1989; Cutler et al., 1997; Rang et al., 1997; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b)].

Esses têm utilidade para o esclarecimento do papel fisiológico da 5-HT na periferia e vêm demonstrando utilidade clínica como drogas antieméticas, principalmente para a redução das intensas náuseas e vômitos que ocorrem com muitas formas de quimioterapia do câncer – um grande avanço, uma vez que esse efeito colateral é um dos principais fatores limitantes do uso efetivo da quimioterapia (Rang et al., 1997).

O antagonismo dos efeitos da 5-HT também é uma propriedade de diversas outras drogas, como as fenotiazinas e as butirofenonas (que são drogas antipsicóticas) e de drogas como o pizotifeno e o cetotifeno. O pizotifeno é utilizado principalmente na profilaxia da enxaqueca; existem alegações de que o cetotifeno é eficaz na asma.

Todas essas drogas têm atuação não-seletiva e não se tem certeza se o antagonismo da 5-HT influencia em seus efeitos globais (Rang et al., 1997).

COMPORTAMENTO DO SISTEMA 5-HTÉRGICO NOS MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE, ESPECIALMENTE NO “LEC”.

Vários relatos atuais indicam haver uma considerável similaridade na sintomatologia e farmacoterapia da ansiedade e de uma série de desordens depressivas (Elliott et al., 1992; Hoehn-Saric et al., 1994). Além disso, sabe-se que os agentes antidepressivos, como a imipramina, podem ser efetivos no tratamento da ansiedade humana e que diversos compostos ansiolíticos, incluindo a buspirona, ipsapirona, ritanserina e quetanserina, possuem eficácia antidepressiva (e.g., Nutt, 1991; Rickels et al., 1993).

Estudos utilizando modelos animais de ansiedade e depressão tem, em contraste, produzido respostas negativas (e.g., Kilts et al., 1981; Cassella et al., 1985; Mason et al., 1987; File et al., 1989; Cole et al., 1995), bem como positivas (e.g., Bodnoff et al., 1988; Costall et al., 1988a; Carli et al., 1989; Griebel et al., 1994; Commissaris et al., 1995) na detecção de efeitos ansiolíticos e antidepressivos, desde que se usem procedimentos altamente específicos e de delineamento muito diferentes (Cutler et al., 1997a). A avaliação dos efeitos induzidos pelos agentes ansiolíticos e antidepressivos sobre o comportamento espontâneo em animais, promove uma informação com elevada sensibilidade e significância do que nos modelos animais “standard”, na detecção de atividade ansiolítica ou antidepressiva (Cutler et al., 1997a).

Métodos etofarmacológicos relacionados à análise comportamental tem sido empregados atualmente numa série de experimentos, tornando-se uma ferramenta poderosa na mensuração dos efeitos das drogas, sobre uma

diversidade de atos e posturas espontâneas, que fazem parte do repertório comportamental dos animais (Eison et al., 1986) e têm durante os ensaios demonstrado serem perfeitamente reproduzíveis, proporcionando um perfil compreensivo do fármaco estudado (Cutler, 1994; Cutler et al., 1997a; Gao et al., 1992a; Gao et al., 1992b).

A buspirona, um agonista parcial 5-HT_{1A} (Carli et al., 1989), é bem conhecida por ser clinicamente efetiva como um composto ansiolítico, somente após administração crônica (Goa et al., 1986; Schweizer et al., 1991). Esta ação ansiolítica relaciona-se principalmente a sua significativa afinidade pelo receptor 5-HT_{1A} (Eison et al., 1986; Taylor et al., 1991).

Existem também relatos que apontam a sua atuação como serênico (ver logo abaixo), reduzindo o comportamento agressivo (Rodgers, 1991) e como tendo de moderada à marcada atividade antidopaminérgica (Eison et al., 1986).

Cutler et al. (1997a) observaram que a buspirona, administrada em camundongos, na dose de 0,75 mg/kg produzia um aumento na imobilidade e reduzia o comportamento agressivo.

Essa verificação estabelece algum paralelo com ensaios anteriores, que indicam que a buspirona possui uma modesta eficácia anticonflito (Schefke et al., 1989). Tais efeitos, típicos dos agentes serênicos (e.g., fluprazina e eltoprazina) são diretamente devidos a redução da utilização da glicose em áreas do cérebro como o hipocampo e girus dentato, embora a utilização da glicose possa encontrar-se aumentada num pequeno número de outros sítios cerebrais (Grasby et al., 1992).

Cutler et al. (1997a) observaram ainda, um aumento na postura de farejamento ("sniffing") do substrato, que foi induzido nas altas doses de buspirona (3.0 mg/kg), provavelmente decorrente do bloqueio de receptores dopaminérgicos pré-sinápticos (Eison et al., 1986). Por exemplo, a quinpirola, um agonista do subtipo de receptor dopaminérgico D₂, que reduz o metabolismo da dopamina, tem do mesmo modo, produzido uma elevação do ato de farejar em camundongos (Gao et al., 1993). Contrastando com estes achados, estudos prévios demonstram que a buspirona aumentou a investigação social quando administrada à camundongos CD₁ por 12-14 dias no bebedouro (Gao et al., 1992a).

Desta forma, diferenças no modo de administração ou na duração do tratamento, podem ter contribuído nas desigualdades entre os resultados encontrados por Cutler et al. (1997a) e de outros autores. É possível que os efeitos ansiogênicos da buspirona em animais habituados à manipulação (Andrews et al., 1993), tenham também relevância neste contexto. Contudo, muitos trabalhos de pesquisa tem relatado que a buspirona mostra uma aparente perda da sua atividade ansiolítica em diversas espécies animais, apesar de demonstrar eficácia ansiolítica no homem (e.g., Pich et al., 1986; Schweizer et al., 1991; Martin et al., 1993; Cole et al., 1994). É provável que a buspirona induza efeitos ansiolíticos por mecanismos diferentes daqueles usados pelos benzodiazepínicos e barbitúricos (Cutler et al., 1997a).

Segundo Rodgers et al. (1997a), embora a buspirona tenha uma ação ansiolítica clinicamente efetiva, ela tem se apresentado problemática nos modelos animais, especialmente quando comparada aos benzodiazepínicos (Howard et al., 1990; Treit, 1991; Barrett et al., 1992; Handley et al., 1992; Martin et al., 1993).

Por exemplo, no LEC, no que tange à tratamento agudo, tem-se encontrado compostos que alcançam efeitos ansiolíticos, substâncias sem nenhum efeito, indo até àqueles com ações ansiogênicas (Handley et al., 1992; Rodgers et al., 1994; Griebel, 1995). Poucos estudos tem investigado os efeitos da administração crônica da buspirona no modelo de ansiedade LEC. Não obstante, enquanto Moser (1989) observou que 16 dias de pré-tratamento com a buspirona foram inefectivos em ratos machos, na aplicação do LEC, um recente trabalho (Cole et al., 1994), demonstrou que 15 dias de pré-tratamento produziu efeito ansiolítico em camundongos machos no mesmo teste.

Infelizmente, como ocorreu com o tratamento agudo, a maioria dos convincentes efeitos anti-ansiedade (2,5-5,0 mg/kg) da buspirona, foram acompanhados por supressão comportamental, conduzindo à dúvidas acerca da sua seletividade (Rodgers et al., 1997b).

Ainda, de acordo com Rodgers et al. (1997a), na tentativa de contornar as dificuldades de interpretação descritas acima, o seu delineamento experimental empregou uma série de doses mais baixas (0,75-3,0 mg/kg/dia; durante 21 dias). Entretanto, seus achados mostraram que a buspirona tem poucos efeitos nestas condições, sendo que nas doses de 0,75 e 1,5 mg/kg, reduziu a avaliação de risco no final dos braços abertos, enquanto que com 3,0 mg/kg, houve diminuição no total de "head-dipping", embora esta postura tenha sido observada no final das vielas abertas. Esta última dose também resultou numa alteração no padrão espaço-temporal dos animais, com os camundongos preferindo os braços abertos em detrimento de outras áreas do LEC.

Portanto, na ausência de outras mudanças comportamentais (e.g., aumento na % de ingressos nas ruelas abertas ou na % de tempo despendido nelas, quando confrontados aos animais controle), qualquer efeito da buspirona sobre os processos relacionados à ansiedade podem ser considerados mínimos. É relevante neste contexto o relato de que a buspirona produz ações ansiogênicas em animais habituados à manipulação diária (Andrews et al., 1993). Talvez, refletem os autores, por esta razão, qualquer efeito ansiolítico oriundo da administração crônica de buspirona tenha sido oposta à influência da manipulação crônica.

Assim mesmo, é importante enfatizar que o regime de manuseio empregado neste trabalho, não alterou o comportamento basal dos animais e de que não há nenhuma evidência de tais interações em estudos realizados previamente pelos mesmos autores (Cole et al., 1994). Concluem os pesquisadores, que o tratamento subcrônico com a buspirona, fracassou no sentido de produzir evidências acerca de atividade anti-ansiedade no modelo LEC com camundongos.

Serenicos. O termo "serênico" (provavelmente tendo-se em vista, sereno, calmo, tranqüilo) foi cunhado, para descrever os efeitos de um grupo de ligantes do receptor 5-HT que, conforme foi demonstrado, inibem seletivamente a agressão ofensiva (Olivier et al., 1995). Embora, produzindo este efeito, aparentemente na ausência de sedação ou estimulação psicomotora, evidências oriundas de testes que não envolvem agressão (Kemble et al., 1987), sugerem que estes agentes, podem aumentar os estados relativos a defesa/medo.

Em um teste adicional desta hipótese, Rodgers et al. (1997b) examinaram os efeitos de dois compostos “serenicos”, a fluprazina e a eltoprazina, no LEC com murinos. Com propósitos comparativos, e particularmente devido a semelhanças na afinidade de ação dos subtipos de receptor 5-HT (5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}), estudos paralelos com agentes ansiogênicos bem conhecidos, como o mCPP e o TFMPP, relacionados à receptores 5-HT, foram também conduzidos (Rodgers et al., 1992).

Embora, nenhum dos compostos testados, tenha produzido efeitos convincentes sobre os índices de ansiedade convencionais do LEC (i.e., % de entradas nos braços abertos, e % de tempo despendido nos mesmos), os dois elevaram acentuadamente o “SAP”, a percentagem de formas “protegidas” de “SAP” e “head-dipping”, e ainda os retornos dentro dos braços fechados (“flatback”). Estes efeitos foram fortemente dose-dependentes e aparentes, nas doses abaixo daquelas produtoras de supressão comportamental significativa (Rodgers et al., 1997b).

A parte de confirmar que os “serênicos” podem realmente aumentar comportamentos, relacionados a ansiedade/medo, este estudo enfatiza, de maneira importante, que a metodologia atual etológica é sensível à mudanças no estado afetivo, que não são necessariamente reveladas, através de mensurações convencionais (Rodgers et al., 1997b).

Ligantes do receptor 5-HT_{1A}. A vasta maioria dos modelos animais de ansiedade, tem rendido perfis inconsistentes e freqüentemente contraditórios, relativos à agonistas/agonistas parciais do receptor 5-HT_{1A}, como o 8-OH-DPAT e a buspirona.

O LEC não é nenhuma exceção a esta “regra”, na qual uma ampla gama de efeitos relacionados à ansiólise, sofrem um processo de neutralização, tornando-se voltados para ações relativas à ansiogenese (Rodgers et al., 1994a; Griebel, 1995). Todavia, uma análise etológica revelou um efeito ansiolítico da buspirona, tanto na administração aguda, quanto na crônica no LEC com murinos (Cole et al., 1994).

Em doses de 2,5-5,0 mg/kg, administradas agudamente, a buspirona induziu um efeito ansiolítico sobre as mensurações convencionais, relacionadas ao ato de esquivar-se dos braços abertos, acoplada à uma supressão profunda da maioria dos comportamentos ativos (ambas as ações são mais evidentes após um tratamento crônico). Entretanto, em baixas doses, efeitos ansiolíticos significantes, foram observados em várias medidas etológicas, incluindo reduções na “avaliação de risco” (veja também Griebel et al., 1997, para achados comparáveis em ratos no LEC). Embora, Rodgers et al., (1994b) também tivessem observado um perfil semelhante, com outro agonista de receptor 5-HT_{1A}, o flesinoxan, algumas diferenças potencialmente importantes, dentro dessa classe, foram visíveis. Por exemplo, considerando que a supressão comportamental, induzida através do tratamento com buspirona, em altas doses, estava associado com turnos prolongados de imobilidade (um efeito dopaminérgico ?), a mesma coisa, não foi observada no tratamento com o flesinoxan, também em altas doses, que, ao invés, pareceu reduzir a avaliação global de comportamento (Rodgers et al., 1997b).

Ainda que, alguma atividade fracamente ansiolítica, também tenha sido observada com o (\pm)-8-OH-DPAT, o efeito predominante deste composto, também foi o de reduzir a produção comportamental (Rodgers et al., 1992). Um trabalho muito recente, mostrou que os efeitos motores deste protótipo ligante de receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT), residem em seu R(+)-enantiômero (agonista total), considerando que qualquer ação fracamente ansiolítica parece ser devido à ação do S(-)-enantiômero (agonista parcial) (Cao et al., 1997a).

As discussões a respeito do mecanismo, pelo qual a buspirona alcança sua ação anti-ansiedade, continuam, embora exista, geralmente uma concordância, que relaciona esse efeito, a uma redução na neurotransmissão da 5-HT (DeVry, 1995). Sugestões de como tal efeito, poderia ser alcançado, variam desde uma ação de um agonista nos autoreceptores somatodendriticos de 5-HT_{1A}, passando através de uma ação de um antagonista sobre receptores pós-sinápticos de 5-HT_{1A}, e terminando em uma combinação de ambos os efeitos (Fletcher et al., 1993).

Dando seguimento as observações preliminares e positivas com (S)-WAY 100135 [(S)-N-tert-butil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazina-1-il)-2-fenilpropanamida diidroclorido), um antagonista de receptor 5-HT_{1A}] Rodgers et al., (1994c), exploraram recentemente, a possibilidade de que o bloqueio do receptor 5-HT_{1A}, produziria um perfil de anti-ansiedade no modelo LEC etológico com murinos. O (S)-WAY 100135 foi estudado nas doses de 2.5-20.0 mg/kg, em camundongos, produzindo unicamente pequenas mudanças comportamentais, na dose de 2,5 e 5,0 mg/kg e consistente redução em algumas mensurações associadas à

“avaliação de risco”; com 10 mg/kg, o composto aumentou a percentagem de ingressos, bem como o tempo despendido nos braços abertos, sem alterar os níveis de atividade geral. Esse clássico perfil ansiolítico foi confirmado através da redução nas mensurações, relacionadas à “avaliação de risco”, incluindo posturas protegidas de “head-dips” e “SAP”.

Embora a maioria dessas mesmas mudanças tenham sido também observadas na dose de 20,0 mg/kg, a ausência de um efeito sobre %t e a tendência em aumentar os comportamentos não-exploratórios sugerem: (1) alguma perda da atividade ansiolítica e (2) uma possível contribuição de fatores não-específicos nas doses mais altas. Esses achados indicam que o (S)-WAY 100135 produz um claro efeito ansiolítico, no LEC com camundongos, um perfil que pode ser distinguido daquele produzido por agonistas parciais do receptor 5-HT_{1A}, no mesmo teste.

Visando o mesmo objetivo, outros autores (Cao et al., 1997b,c,d), mais recentemente, estudaram uma ampla gama de compostos, que (com graus variados de seletividade) exercessem efeitos antagônicos nestes receptores (5-HT_{1A}). Estes resultados revelaram que, apesar da variação na estrutura química e grau de seletividade para com os receptores 5-HT_{1A}, estes agentes compartilham uma habilidade para reduzir a ansiedade em camundongos Suíço-Webster. Em resumo, efeitos ansiolíticos em ambos índices, sejam eles convencionais ou etológicos, foram observados com (-)pindolol, ligação pindo-5-HT_{1A}, SDZ 216525, WAY 100635 e pMPPI. De modo importante, do ponto de vista da especificidade farmacológica, tais efeitos não foram observados com diversas doses de (+)pindolol, metoprolol (antagonista β_1), ICI-118,551 (antagonista β_2) ou prazosin

(antagonista α_1). Além disso, ambos NAN-190 (uma combinação de antagonistas 5-HT_{1A}/ α_1) e buspirona (agonista parcial) foram destituídos de atividade ansiolítica convincente, nestes estudos. Os comportamentos ativos foram intensamente suprimidos com a utilização de altas doses.

O perfil relativo à dose-resposta para os antagonistas de 5-HT_{1A}, invariavelmente configuraram, perda de atividade ou não-especificidade comportamental, evidente nas doses mais altas (Rodgers et al., 1997b).

Em conjunto, estes resultados são muito encorajadores, particularmente quanto ao aspecto relativo a uma ampla separação de doses com efeito ansiolítico e motor (um padrão muito diferente daquele observado com agonistas totais e parciais do receptor 5-HT_{1A}).

Entretanto, embora estes achados sugiram um potencial terapêutico para os antagonistas do 5-HT_{1A}, na condução das desordens da ansiedade, o assunto relativo a uma ação pré- versus pós-sinapse permanece em aberto (Rodgers et al., 1997b).

Assim, enquanto visões tradicionais sobre a 5-HT e a ansiedade, podem sugerir um local pós-sináptico (i.e., redução na transmissão da 5-HT), deve ser obtido apoio experimental, através de estudos acerca dos efeitos da aplicação direta de antagonistas, em locais como os núcleos de rafe e hipocampo. Neste contexto, é digno que nota, que efeitos ansiolíticos tem sido relatados, em vários modelos com ratos, seguidos de injeção intra-hipocampal, de uma combinação de antagonista do 5-HT_{1A} e β -bloqueador o tertatolol (File et al., 1996), enquanto que

injeções de 8-OH-DPAT hipocámpais e amigdalóides aumentam a ansiedade (Hodges et al., 1987; Andrews et al., 1994).

Todavia, o fato de que manipulações no receptor 5-HT_{1A}, parecem ter efeitos mais consistentes, em modelos de ansiedade com camundongos (vs rato) (e.g., Rodgers et al., 1994a; Griebel, 1995; Cao et al., 1997b,c,d) e também, de que existe uma clara diferença, entre estas espécies, nas respostas fisiológicas receptor-mediadas pelo 5-HT_{1A} [e.g., induzidas por 8-OH-DPAT, produzindo hipotermia: com ação pré-sináptica em camundongos, mas pós-sináptica em ratos (Bill et al., 1991)], uma interpretação contrária à estes achados, deve ser realizada com cautela (Rodgers et al., 1997b).

Agentes antidepressivos/antipânico. É conhecido, já há algum tempo, que desordens do pânico respondem muito melhor à certos antidepressivos (fenelzina e imipramina), do que à agentes ansiolíticos tradicionais (Klein, 1981; Nutt, 1990). Uma pesquisa mais recente, sugeriu que a segunda geração de antidepressivos, em particular os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (SSRI), são também efetivos à este respeito e, podem atualmente possuir vantagem terapêutica sobre os tricíclicos convencionais (Ballenger, 1990; Den Boer et al., 1995).

Contudo, o tratamento com imipramina, seja agudo ou crônico, não alterou os índices de ansiedade no LEC com murinos (Cole et al., 1995), com resultados negativos, relatados também, para o tratamento crônico com a fluvoxamina (SSRI) (Rodgers et al., 1997c).

Em contraste, baixas doses do bloqueador de recaptação noradrenalina-seletivo, maprotilina, produziram uma redução seletiva, relativa ao ato de esquivar-se dos braços abertos (Rodgers et al., 1997c), sugerindo uma possível aplicação terapêutica, na clínica da ansiedade e/ou no paciente ansioso-depressivo. Surpreendentemente, o antidepressivo atípico, tianeptina, foi considerado capaz de produzir, mudanças ansiogênicas no comportamento, após tratamento subcrônico, no LEC e em modelos de interação sociais (Rodgers et al., 1997a). Embora, este achado, não fosse incompatível, com seu presumido mecanismo de ação, (aumento da recaptação da 5-HT), ele é embaraçoso devido a seu uso (pelo menos na França) como um medicamento de prescrição (Rodgers et al., 1997b).

Não obstante, a falta de eficácia da imipramina e fluvoxamina sob as presentes condições de teste, poder-se-ia sugerir, que o murino no LEC, não é sensível à compostos, com eficácia clínica estabelecida, na condução das desordens do pânico (Rodgers et al., 1997b). Esta conclusão foi apoiada mais tarde, por uma recente observação, de que vários antagonistas do receptor CCK_B, (L-365260, PD135158), que pensou-se ter potencial como agentes antipânico, também são ineficazes quando são empregados numa ampla gama de doses (Johnson et al., 1996).

Agentes pró-ansiedade/panicogênicos. Algumas referências, já foram realizadas anteriormente, acerca dos efeitos ansiogênicos dos agonistas do receptor 5-HT_{1B/2C} (TFMPP, mCPP) (Rodgers et al., 1992), de agonista inverso de receptor benzodiazepínico (FG 7142) (Rodgers et al., 1995) e de antagonistas do receptor GABA_A (picrotoxina, PTZ) (Rodgers et al., 1995; Dalvi et al., 1996), no atual modelo etológico.

Johnson et al. (1996), porém, não observaram qualquer sinal consistente, de aumento de ansiedade, com os supostos agentes panicogênicos, CCK-4 e CCK-8, como também com o isoproterenol e o lactato de sódio (Rodgers et al., 1995).

Estes achados, não só confirmam a sensibilidade diferencial do LEC com murinos, na modulação da ansiedade, mas também permitem uma caracterização mais sólida do procedimento, talvez como um modelo mais adaptado para “screening” de compostos, com potencial clínico, no tratamento das desordens da ansiedade generalizada e de estudos dos mecanismos relacionados (Rodgers et al., 1997b).

Entrementes, deveria ser levado em consideração, que esta conclusão pode, somente ser bem aplicada, no uso do modelo com animais intactos [i.e., não submetidos a nenhum tratamento, virgens (“test-naive”)], já que Holmes et al. (1996) obtiveram recentemente evidências de que, como para os ratos (File et al., 1991), a natureza da resposta de ansiedade exibida em camundongos experimentados (i.e., submetidos a algum tratamento) no teste, difere *qualitativamente* das que são observadas em indivíduos testados intactos [i.e., não submetidos a nenhum tratamento (“virgens”). Devido às possíveis implicações deste achado, estudos comportamentais e farmacológicos acerca de se “re-testar a ansiedade” são aguardados ansiosamente (Rodgers et al., 1997b).

A buspirona na dose de 3,0 mg/kg, segundo Cao et al. (1997e) produziu efeitos ansiolíticos modestos (aumento na percentagem de ingressos nos braços abertos; redução de SAP e flatback approach; associado com aumento do grooming e freezing) *per se*, o que não ocorreu com doses mais baixas.

Griebel et al. (1998) observaram que a buspirona nas doses de 1 e 4 mg/kg i.p. unicamente reduziram as atividades associadas à avaliação de risco. Belzung et al. (1997) apregoam a utilização de 4,0 mg/kg de buspirona para camundongos Suiços na aplicação do LEC. Da Rocha et al. (1997) utilizaram em camundongos submetidos ao teste de natação forçada, 0,5 mg/kg s.c. de buspirona e 8 mg/kg s.c. de WAY 100135.

2.8. ACUPUNTURA NA ANSIEDADE.

As considerações iniciais acerca da utilização da acupuntura, nos distúrbios associados com a ansiedade, incidem sobretudo na inexistência de uma literatura voltada para esse importante e contemporâneo tema. A implacável privação de estudos referentes a aplicação de modelos animais, concernente à ansiedade ou qualquer outra forma de manipulação farmacológica, aliada à neurobiologia das alterações afetivas com o uso da acupuntura é, em parte, explicado pelo fato de que uma grande parcela dos grupos de pesquisa que se dedicam à essa área, ignoram e/ou não reconhecem essa técnica milenar chinesa. Por outro lado, acupunturistas com renomada experiência neste campo de atuação, aparentemente não possuem interesse e/ou formação científica adequados para que haja produção de trabalhos de pesquisa nessa esfera de domínio.

Não obstante a completa ausência de ensaios experimentais vinculados à essa abordagem terapêutica relacionada à ansiedade, algumas ponderações relevantes merecem respeito.

A utilização da acupuntura no Ocidente, foi acompanhada de grande ceticismo por parte dos cientistas ocidentais. Eles se baseavam nos experimentos de Beecher (1955) que demonstrou que embora a morfina aliviasse a dor da maioria dos pacientes, injeções de açúcar (placebo) reduziam a dor em 30% dos pacientes que acreditavam ter tomado morfina (Beecher, 1955). Desta forma, muitos pesquisadores presumiram que a analgesia por acupuntura (AA) funcionava como placebo (efeito psicológico). Este ceticismo persistiu, mesmo com a demonstração da baixa correlação entre a sugestibilidade e a AA (Liao, 1978) e da existência de mecanismos fisiológicos distintos entre a analgesia hipnótica e a AA (Goldstein e Hilgard, 1975; Baber e Mayer, 1977).

Desde então, muitas pesquisas científicas foram realizadas com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos da acupuntura, principalmente na acupuntura analgésica. Grande avanço neste campo ocorreu em 1976 com a descoberta das endorfinas. Dois grupos independentes, um estudando voluntários humanos (Mayer et al., 1977) e o outro animais de laboratório (Pomeranz e Chiu, 1976), demonstraram que a naloxona (antagonista opióide) bloqueava a AA. Assim surgiu a teoria das endorfinas para acupuntura, que propõe que a AA seria o resultado da estimulação de nervos periféricos que mandariam impulsos para o encéfalo que então liberaria endorfinas, induzindo, assim, analgesia.

Esta hipótese e muitas outras estimularam pesquisadores em todo o mundo a estudarem a acupuntura.

A maioria das pesquisas realizadas nesta época concentrou-se no estudo dos mecanismos da analgesia ou anestesia por acupuntura, tentando relacionar os neurotransmissores envolvidos bem como os sítios de ação no SNC. Tais estudos tiveram como base a microinjeção de drogas ou lesões em áreas específicas, a detecção de neurotransmissores e seus metabólitos, e de potenciais evocados e o estudo dos eventos intracelulares desencadeados pela estimulação de pontos de acupuntura (Han, 1987). Mais recentemente técnicas modernas de mapeamento da atividade neuronal como a ressonância magnética funcional, tomografia por emissão de pósitrons e a expressão de genes de resposta imediata tem sido utilizadas na elucidação das estruturas encefálicas envolvidas nos efeitos acupuntura.

Atualmente, existe uma preocupação não apenas com a comprovação de que a acupuntura é capaz de induzir efeitos fisiológicos significativos, mas também que estes efeitos são decorrentes da estimulação de pontos de acupuntura. Apesar de todo o questionamento recente sobre a validade ética do emprego de um grupo placebo em experimentos clínicos investigando situações nas quais já exista terapêutica comprovadamente eficaz, é evidente que no modelo científico ideal em pesquisa clínica o efeito placebo deveria sempre ser testado. Nesse sentido, o grupo placebo mais comumente utilizado em acupuntura consiste na estimulação em regiões não-ponto (acupuntura Sham). Uma questão relevante na pesquisa básica e um dos aspectos que tem limitado o estudo da acupuntura em animais de laboratórios, é a necessidade da imobilização ou do

uso de anestésicos para a inserção e permanência das agulhas de acupuntura nos animais. Tanto a imobilização como a anestesia induz várias respostas orgânicas que podem influenciar as respostas à acupuntura. Desta forma, uma questão de profunda relevância em acupuntura reside na definição das bases neurais envolvidas na analgesia associada a imobilização, em confronto com a analgesia induzida pela mera estimulação de não-pontos e finalmente com as estruturas encefálicas especificamente envolvidas na analgesia decorrente da estimulação dos pontos de acupuntura.

Por muito tempo, no estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos na acupuntura, o encéfalo foi visto como uma caixa preta, onde se sabia que de sua estimulação, resultava a liberação de endorfinas. No entanto os mecanismos específicos envolvidos nesta liberação assim como as estruturas encefálicas ativadas eram completamente desconhecidas. Dentre os primeiros estudos para decifrar a circuitaria envolvida na acupuntura encontram-se aqueles desenvolvidos pelo grupo do Dr. Takeshige no Japão. Este grupo combinou técnicas de lesão e a análise de potenciais evocados para estudar a circuitaria envolvida na analgesia pela acupuntura, e compara-la com a analgesia induzida por estresse (AIE) e com a analgesia induzida pela estimulação em não-pontos (ANP). Estes estudos tentaram descrever uma circuitaria neuronal complexa relacionada a AA, dividida em duas vias: uma via aferente da acupuntura analgésica e uma via eferente (ou sistema descendente de inibição da dor). A via aferente começaria no ponto de acupuntura e ascenderia através do trato anterior contralateral da medula espinhal (Sato et al., 1991) até algumas estruturas do encéfalo dentre elas os núcleos gigantocelular reticular, o magno da rafe e a substância cinzenta periaquedutal

dorsal (PAGd) (Takeshige et al., 1992b). A partir da PAGd, que seria uma região chave para a acupuntura analgésica, a via aferente da AA se projetaria para várias outras estruturas formando um circuito complexo, que terminaria no núcleo arqueado e na eminência média. Esta última, então, liberaria β endorfinas, que seria uma das formas de se obter efeitos analgésicos. A via eferente da AA por sua vez, começaria no núcleo arqueado posterior que projetar-se-ia para o núcleo ventromedial do hipotálamo onde há várias conexões com sistemas noradrenérgicos (principalmente *locus coeruleus*) e serotoninérgicos (principalmente núcleo dorsal da rafe).

Apesar das limitações dos dados colocados naquela hipótese, principalmente quanto a hodologia sugerida, os trabalhos do grupo de Takeshige sugeriram estruturas que possivelmente estão envolvidas na acupuntura, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo dorsal de rafe (DR), o *locus coeruleus* (LC), o núcleo arqueado do hipotálamo (ARQ) e o núcleo magno da rafe (RM). A lesão de qualquer um desses núcleos pode atenuar ou abolir os efeitos da eletroacupuntura analgésica (Takeshige et al., 1980; Takeshige et al., 1991; Takeshige et al., 1992a; Takeshige et al., 1992c; Takeshige et al., 1992b).

Fora da área de analgesia e expandindo a aceitação dos efeitos da acupuntura, técnicas modernas de mapeamento da atividade neuronal têm sido utilizadas mais recentemente. Essas técnicas, como a tomografia por emissão de pósitrons e a ressonância magnética funcional (RMf) permitem o estudo de estruturas no SNC que estão mais ativadas após um estímulo específico e possuem a grande vantagem de serem não invasivas o que facilita o estudo em

humanos. Estudos com RMf mostraram que a estimulação de pontos de acupuntura relacionados à visão (VA1, VA2, VA3 e VA8) induz padrões de ativação em regiões específicas do córtex de maneira semelhante a estimulação visual (foco de ativação no lobo occipital). A estimulação de uma região não-ponto induz padrões de ativação diferentes daqueles induzidos pela estimulação visual e do ponto (Cho et al., 1998). A estimulação dos pontos 36E e 4F ativam estruturas relacionadas à via antinociceptiva descendente e reduz a ativação de estruturas límbicas associadas a dor (Wu et al., 1999). Um estudo utilizando a tomografia por emissão de pósitrons demonstrou que a estimulação de 4F induz ativação do hipotálamo, mesencéfalo, ínsula, córtex cingulado anterior e cerebelo, sendo o hipotálamo uma região central envolvida na estimulação de pontos analgésicos clássicos (Hsieh et al., 2001).

Desde há muito tempo, a Medicina Tradicional Chinesa (MTC) tem devotado uma especial atenção e empenho na profilaxia e no tratamento das perturbações emocionais associadas ao estresse, a depressão e a afetividade.

A MTC, mesmo tendo sido originada milhares de anos atrás e amadurecida centenas de anos antes de Cristo, pode diagnosticar e tratar com sucesso os problemas de saúde gerados pelo estilo de vida do século XX, o qual se encontra anos-luz distante da sociedade em que viviam os antigos camponeses, na qual a MTC se originou (Maciocia, 1996).

Embora existam diferenças culturais entre as sociedades ocidental e oriental, elas não devem ser superestimadas. Um dos pontos mais fortes da MTC, e considerado uma verdade universal, é a sua simplicidade.

Por exemplo, as causas da patologia (clima, emoções, dieta, etc) são tão básicas que podem aplicar-se a qualquer sociedade e a qualquer tempo. Fúria, tristeza, dor, medo são sentimentos básicos encontrados em qualquer ser humano e que certamente ultrapassam as fronteiras culturais (Maciocia, 1996).

Não obstante a MTC considerar o corpo e a mente como um todo integrado, apresentando um profundo efeito sobre a mente, limitações são encontradas neste campo. O papel do acupunturista e do médico em qualquer tipo de medicina e a qualquer tempo, não é o de um mestre espiritual. No que se refere a problemas graves de ordem mental, a acupuntura somente poderá auxiliar se combinada com o trabalho de um psicoterapeuta adequadamente treinado (Maciocia, 1996).

Identificar a causa da desarmonia do paciente é uma das partes mais importantes da prática médica chinesa. É importante não considerar o desequilíbrio em questão como uma causa da patologia, mas simplesmente uma expressão da desarmonia presente. A MTC enfatiza o equilíbrio como uma questão chave da saúde. Por exemplo, o equilíbrio entre o repouso e os exercícios, na dieta, nas atividades sexuais, e climático (Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996).

O diagnóstico chinês está intimamente relacionado com o padrão de identificação e é baseado no princípio fundamental de que os sinais e sintomas refletem a condição dos sistemas internos. Por vários séculos, o diagnóstico chinês tem desenvolvido um sistema extremamente sofisticado entre os sinais externos e os sistemas internos, estabelecendo uma correlação entre eles (Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996).

Após elaborar um diagnóstico e identificar o padrão, o próximo passo consiste em determinar o princípio de tratamento a ser adotado e iniciar a terapia (Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996).

Este trabalho de pesquisa emprega na sua metodologia somente dois acupontos (i.e., dois pontos de acupuntura), selecionados entre os mais de 1.100 conhecidos e descritos no homem. O fator gerador determinante dessa opção, fundamenta-se na experiência clínica do autor e nos resultados obtidos de ensaios anteriores, realizados em colaboração com colegas* do Departamento de Fisiologia, Morfologia e Anatomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que encontram-se em fase final de elaboração. Dessa maneira, a preferência recaiu sobre os acupontos C7 e Yintang.

O primeiro refere-se ao ponto número sete do meridiano do coração, enquanto que o segundo é um ponto considerado extra (i.e., localiza-se fora dos meridianos reconhecidos).

A MTC afirma que o coração (Xin) é a residência da mente (Shen), assim, a atividade mental e a consciência “residem” nele (Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996). Isto significa que o estado do coração afetará as atividades mentais, incluindo o estado emocional.

* Prof^s. Armando José Ribeiro Samico e George Chaves Jimenez.

Em particular, cinco funções são afetadas pelo estado do coração (Maciocia, 1996):

Atividade mental (incluindo as emoções),
Consciência,
Memória,
Pensamento e
Sono.

Se o coração é forte e o sangue (Xue) abundante, haverá uma atividade mental normal, uma vida emocional equilibrada, consciência clara, memória e pensamento bons e um sono saudável. Se o coração é fraco e o sangue deficiente, podem ocorrer alterações mentais (tais como depressão e ansiedade), falta de memória, pensamento afetado, insônia ou sonolência e, em casos extremos, inconsciência. As manifestações clínicas de deficiência do sangue do coração são: agitação mental, depressão, ansiedade e insônia. Não é possível apresentar deficiência do Yin do coração sem a deficiência do sangue do coração, porque o Yin engloba o sangue. Os sinais clínicos e a abordagem terapêutica são praticamente os mesmos (Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996).

O meridiano do coração origina-se no coração. A seguir emerge, atravessa o diafragma e conecta-se com o intestino delgado. Uma ramificação do coração ascende para a garganta e olhos. Outra ramificação penetra no pulmão e surge na axila, de onde junta-se com o meridiano superficial percorrendo ao longo do aspecto medial do braço para terminar na face medial da ponta do dedo mínimo (Maciocia, 1996).

O ponto número sete do meridiano do coração C7 ou **SHENMEN** (porta da mente) têm como características (Maciocia, 1996):

Natureza – Ponto Fonte

Ação – Acalma a mente

Ponto de Sedação

Nutre o sangue do coração

Localização – No lado radial do tendão do músculo flexor cubital do carpo.

Este é o ponto mais importante sobre o meridiano do coração, sendo um dos pontos mais importantes do corpo. Pode ser utilizado, virtualmente, em qualquer padrão do coração, para acalmar a mente, sua principal função (Maciocia, 1996).

Todavia, nutre primariamente o sangue do coração, sendo o ponto de escolha para tratar deficiência de sangue do coração, causada pela ansiedade, insônia, memória fraca, estresse e palpitação (Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996).

Desde a Dinastia Ming (1368-1644), alguns médicos chineses atribuíram as funções da inteligência e da memória ao cérebro, e não ao coração, como é tradicional na MTC. Portanto, a partir dessa Dinastia, uma nova teoria médica se desenvolveu paralelamente à tradicional, segundo a qual as funções intelectuais eram atribuídas ao cérebro em vez do coração. Significativamente, estas novas teorias emergiram antes da introdução da medicina ocidental na China (Maciocia, 1996).

Ponto Extra

YINTANG (“hall” da foca)

Localização: É assinalado no camundongo, no ponto equidistante a uma linha imaginária traçada da comissura lateral de um olho ao outro, sobre o osso frontal (Cole et al., 1994).

Ação (Maciocia, 1996): Elimina o Vento,
Interrompe convulsões e
Acalma a mente.

Geralmente na prática diária, o Yintang é usado para acalmar a mente e aliviar a ansiedade (Maciocia, 1996).

3.OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos obtidos com a utilização da acupuntura sobre a atividade comportamental espontânea em camundongos submetidos ao modelo de ansiedade labirinto elevado em forma de cruz.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Verificar se a acupuntura causa, *per se*, efeitos tranqüilizantes (envolvimento do sistema GABAérgico).

3.2.2. Verificar se a acupuntura causa, *per se*, efeitos antidepressivos/ansiolíticos (envolvimento do sistema 5-HTérgico).

3.2.3. Verificar se a acupuntura causa, *per si*, efeitos analgésicos/ansiolíticos (envolvimento do sistema opióide).

3.2.4. Comparar quantitativamente os efeitos tranqüilizantes/ansiolíticos da acupuntura com aqueles dos benzodiazepínicos.

4.HIPÓTESE.

As hipóteses, sejam elas nulas ou alternativas, edificadas nesta pesquisa, obedecerão rigorosamente a ordem cronológica dos eventos. Assim, para os treze grupos de tratamento que irão compor a aplicação do modelo animal de ansiedade, o labirinto elevado em forma de cruz, que investigam individualmente o comportamento exploratório espontâneo, o nível de ansiedade e o sistema de mediadores envolvidos, as hipóteses formuladas seguirão o seguinte modelo: a hipótese nula (H_0) presume, que do ponto de vista estatístico, não haverá diferenças significativas dos efeitos obtidos entre os treze tratamentos, seja ele a utilização de agonistas, antagonistas, da acupuntura ou do controle, enquanto que a hipótese alternativa (H_1) pressupõe diferença estatisticamente significativa em pelo menos um deles. No caso de se rejeitar H_0 , será então verificado qual(is) tratamento(s) é(são) diferenciado(s), comparando-se o grau desta desigualdade.

$$H_0 : T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6 = T_7 = T_8 = T_9 = T_{10} = T_{11} = T_{12} = T_{13}$$

$$H_1 : T_i \neq T_j, \text{ sendo } i, j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 \text{ e } i \neq j$$

5. MATERIAL E MÉTODOS.

5.1. LOCAL DO EXPERIMENTO:

Esta pesquisa foi desenvolvida no **Laboratório do Estudo do Comportamento** sob os auspícios do **LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA MOLECULAR HUMANA** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Torna-se imperioso ressaltar aqui, que o **Laboratório do Estudo do Comportamento**, teve seu nascedouro muito recentemente, sendo edificado e estruturado criteriosamente, com a preocupação primordial de garantir e resguardar um ambiente, que pudesse propiciar o menor índice possível de influências associadas à caracteres ansiogênicos, visto que o paradigma empregado neste trabalho, o labirinto elevado em forma de cruz (LEC), um modelo animal farmacologicamente clássico e tradicional para a avaliação do nível de ansiedade, contempla o comportamento espontâneo, altamente suscetível à esses efeitos. Dessa maneira, quanto menos ansiosos os animais se conservarem, mais fidedignos serão os resultados observados na aplicação do teste. Algumas variáveis que poderiam interferir nessas circunstâncias foram ativamente observadas e padronizadas, tais como níveis de ruído, iluminação e temperatura.

Além disso, para assegurar a padronização de outras variáveis, o mencionado laboratório foi dividido internamente em quatro cômodos distintos e fisicamente separados. Um compartimento, denominado sala de teste, desprovido de janelas e acusticamente isolado, por conta disso, beneficiado com um aparelho de ar-condicionado, abriga o aparato (LEC), firmemente fixo ao solo, já que a diversidade de local e/ou posicionamento produzem ansiedade, estandartizando, portanto, todos os ensaios. Imediatamente acima do LEC, à 90⁰, localiza-se uma mini-câmera, que compõe um sistema de circuito fechado de TV, acoplado a um vídeo-cassete, visando o registro do comportamento animal.

Outro recinto, contíguo, destinado à manipulação dos camundongos, alberga também o restante do equipamento de vídeo, através do qual os animais são monitorados e, por esses motivos nomeada sala de manipulação e monitoração. Desse modo, os camundongos, convenientemente ficam inteiramente sozinhos, para poderem exhibir, sem constrangimentos e sem interferências, suas atitudes e posturas espontâneas, objetos do estudo do comportamento. A existência do mini-biotério (terceiro cômodo), neste complexo, inside sobre quatro razões principais, incluídas naquela relação de variáveis controladas citadas acima, sendo a primeira delas associada intimamente ao fato, preciosamente relevante, desses animais possuírem hábitos notívagos i.e., exibirem um comportamento espontâneo muito mais exuberante e rico durante a noite.

Destarte, o mini-biotério, também privado de janelas, foi munido de condições para simular essa peculiar circunstância, tornando-se dotado de um “timer”, aparelho responsável pelo acionamento da luz branca, similar a luz do dia, às 19:00 horas, desligando-a às 7:00 horas, invertendo conseqüentemente o ciclo de luz por um espaço de tempo de doze horas. Essa específica providência, permite a observação dos animais, durante à aplicação do LEC, no período em que eles estão mais ativos, proporcionando maior riqueza de detalhes, extremamente valiosos nos ensaios experimentais vinculados ao estudo comportamental. Esse recinto, desde que integralmente fechado, foi provido, também de aparelho de ar-condicionado e exaustor. Uma segunda causa ligada ao fato de haver um mini-biotério integrado no laboratório do estudo do comportamento, refere-se ao isolamento dos animais do restante do departamento, evitando assim, o seu trânsito por espaços onde não há controle de nenhuma das variáveis aludidas anteriormente, especialmente nos momentos prévios à aplicação do teste LEC. Além disso, os camundongos não são expostos à presença de possíveis predadores, à odor destes ou de espécies co-específicas mais agressivas ou ainda ao cheiro de fêmeas, muito menos a sua presença física, porque podem iniciar um confronto instintivo de posse e liderança, muitas vezes mutilando-se, situações radicalmente ansiogênicas.

Por fim, a quarta e última razão da existência do mini-biotério anexo às outras salas do laboratório, está estreitamente relacionada à condição de sociabilização dos animais, desde que são gregários, fator anti-ansiedade inerente ao LEC.

O quarto espaço do laboratório é utilizado para outras técnicas comportamentais, não incluídas nesse trabalho. Tanto a sala de manipulação e monitorização (que também possui aparelho de ar-condicionado), como a de teste, são sujeitas à iluminação indireta, dispostas ao longo das paredes (nunca no teto), proporcionada por lâmpadas de coloração vermelha (fosca) sem brilho (40 W). Enquanto que a temperatura foi controlada ao redor de $21\pm 3^{\circ}$ C, o nível de ruído foi mantido subliminar devido ao piso emborrachado, que absorve o barulho, do silêncio conservado durante todo o experimento e do calçado do investigador, com sola vulcanizada, sem salto. Todas essas medidas objetivam a criação de um meio-ambiente não-ansio gênico, para que os camundongos possam sair de seu alojamento, visando fazerem parte dos experimentos, sem sofrerem nenhuma interrupção na manutenção dessas variáveis. (Ver fotografias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

5.2. ANIMAIS:

Foram utilizados, em todos os treze tratamentos preconizados, camundongos *Mus musculus*, albino suíço, adultos, com idade entre 12-15 semanas, machos e com peso aproximado de 35g, distribuídos da seguinte forma: constituindo os seis primeiros grupos de tratamento, 15 animais para cada grupo; integrando os próximos cinco grupos de tratamento, 12 animais para cada grupo; e, finalmente, fazendo parte dos dois últimos grupos de tratamento, 10 animais para cada grupo, perfazendo um total de 170 animais.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, que continham serragem, trocada semanalmente [8 animais/caixa (45x28x13 cm)], sob condições de ciclo de luz, revertida à cada 12 horas (a iluminação era acionada às 19:00 h e interrompida às 07:00 h), por no mínimo, cinco semanas previamente à aplicação do teste “LEC”, que foi realizada durante o meio do ciclo LD [“Light-Dark”– “mid-dark phase” (10:00-14:00 h)].

Este procedimento, permitiu testar os camundongos, durante o período ativo desses animais noturnos. A alimentação (ração Cargil)/água foi *ad libitum*, exceto no decorrer do teste (Ver fotografias 8, 9 e 10).

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

5.3.1. MODELO EXPERIMENTAL; DIVISÃO E AGRUPAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Foi empregado um modelo animal farmacologicamente clássico e tradicional para a avaliação do nível de ansiedade, representado pelo labirinto elevado em forma de cruz (LEC), conforme o proposto por Lister (1987), para camundongos. Assim, o aparato foi edificado com acrílico transparente, tendo o piso na coloração preta e as laterais e paredes dos braços fechados translúcido, nas seguintes medidas: dois braços abertos (30x5 cm), e dois fechados (30x5x15 cm), emanados de uma plataforma ou praça central comum (5x5 cm), modelando um formato de cruz.

Todo aparato eleva-se a 60 cm acima do nível do solo, com a adição de bordas ao redor do perímetro das passarelas abertas de 0,25 cm (Ver fotografias 11, 12 e 13).

Digno de nota é o fato desse modelo animal ter sido primeiramente padronizado para esses parâmetros descritos na metodologia, previamente aos experimentos, tais como variáveis do tipo, linhagem utilizada, níveis de iluminação, temperatura, bordas dos braços abertos etc. Estando em conformidade com as assertivas de Rodgers que afirma que essa padronização fidedignamente produza valores médios, de % de ingressos nos ramos abertos e % de tempo despendido nas vielas abertas, ao redor de 20-40% (Ver p. 47).

No intuito de facilitar a adaptação, os camundongos foram transportados para a sala de manipulação e monitorização, oriundos do mini-biotério, no mínimo, uma hora antes da aplicação do LEC, sendo que aos trinta minutos desse período de tempo, cada animal sujeitou-se randomicamente (Amostragem do tipo Sorteio Sistemático) aos tratamentos edificadas. Tal procedimento estatístico consistiu no sorteio de um tratamento entre os existentes, seguido do sorteio de mais um entre os restantes, e assim subseqüentemente até o último. O resultado dessa técnica de aleatoriamiento foi a seqüência: A, D, C, B, E, H, F, J, I, G, K, L e M.

A seguir, procedeu-se ao sorteio das caixas de alojamento encontradas no mini-biotério e, a partir da primeira, os animais foram alocados sistematicamente nos tratamentos, conforme sua entrada, configurando uma sucessão aleatória, onde o primeiro foi alojado no tratamento A, o segundo no D, o terceiro no C, o

quarto no B, e assim seqüencialmente e sucessivamente até o último, perfazendo portanto, um total de cento e setenta (170) camundongos.

Após períodos de tempo dispares, dependendo da droga utilizada, os animais sujeitarem-se à aplicação do teste de ansiedade LEC, dando-se início as mensurações, quando um camundongo foi alocado na plataforma central, voltado para um braço aberto. No mínimo foram realizados um teste com um camundongo para cada um dos treze tratamentos num mesmo dia. A duração padrão destas medidas foi de cinco minutos e, o “LEC” sofreu uma limpeza completa entre os ensaios com as unidades experimentais.

Conforme já descrito, foi utilizado um sistema de circuito fechado de TV, constituído de equipamentos como, monitor de vídeo, videocassete (vídeocamera e reproduzidor de vídeo), para o registro dos comportamentos dos animais, cuja camera foi posicionada acima do labirinto, na sala de teste, em um ângulo de aproximadamente 90^o, objetivando a discriminação do número de ingressos nos braços abertos e fechados, bem como da verificação do tempo despendido sobre esses ramos. O monitor de vídeo e o gravador de vídeo-cassete foram instalados fora da sala de teste, em uma sala adjacente (sala de manipulação e monitorização). As fitas de vídeo foram então analisadas posteriormente, por um indivíduo previamente treinado, que conhecia somente as siglas em código A, B, C, D etc, sem saber a que tratamento pertenciam. Esse modo de proceder teve por fim configurar um experimento duplo cego. Os arquivos de dados gerados, tornaram-se objeto de apreciação de uma análise estatística procedida da seguinte maneira (Conover, 1980; Altman et al., 1991):

1. Objetivo Estatístico -

Verificar se existe ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento em relação a cada uma das variáveis dependentes, isto é %n^o e %t, e, no caso de haver essa desigualdade determinar os pares que as apresentam.

2. Métodos Estatísticos -

Para análise dos dados foram obtidos: a distribuição absoluta e percentual do número de animais por grupo, os valores médios, os desvios padrões e os coeficientes de variação (Técnicas de Estatística Descritiva) para as variáveis dependentes (%no e %t) e utilizados, o teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de Estatística Inferencial). No caso da verificação de diferença significativa estatisticamente entre os grupos foi usado o teste de comparações pareadas do teste de Kruskal-Wallis (Técnicas de Estatística Inferencial).

Destaca-se que a escolha da Análise de Variância representada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em vez do teste paramétrico F (ANOVA) foi devido a não verificação da hipótese de igualdade das variâncias entre os grupos e a ausência de normalidade para cada uma das variáveis dependentes, além, é óbvio, da existência de um grupo de tratamento, representado pela acupuntura, que por não ser mensurável, comporta-se como uma variável qualitativa. A hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste de Levene e a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilks.

As hipóteses adotadas para o objetivo proposto, em relação a cada uma das variáveis dependentes, foram:

H_0 : Não existe diferença significativa entre os grupos;

H_1 : Existe pelo menos um dos grupos que difere dos demais.

O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0% e os programas utilizados para o cálculos foram o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 11 e o SAS (Statistical Analysis System) na versão 8.0.

5.3.2. TRATAMENTOS.

O grupo de tratamento A constituiu-se no grupo controle/salina (veículo isotônico). Esses animais foram testados no LEC após 40 minutos.

O grupo de tratamento B foi submetido à aplicação de acupuntura que foi realizada com agulhas de aço inox auriculares, sem a promoção de qualquer tipo de estimulação, a não ser a própria punctura, por um período de tempo médio de dez minutos, que teve início invariavelmente entre 10:00 h e 13:00 h, utilizando-se unicamente os seguintes pontos: C7 e o ponto extra Yin Tang (Figura 1). Os acupontos foram confirmados com o auxílio de um toposcópio*. Os animais foram testados no LEC após 40 minutos (Cole et al., 1994; Jimenez et al., 1994; Samico et al., 1994a; Samico et al., 1994b).

O grupo de tratamento C sujeitou-se à administração de droga benzodiazepínica, representado aqui pelo diazepam, na dose de 2,5 mg/kg. O diazepam foi dissolvido em solução salina isotônica com o auxílio de 2 gotas de Tween 80 para cada 10 ml. Os animais foram testados no LEC após 20 minutos (Rodgers et al., 1992b; Rodgers et al., 1993a; Cole et al., 1995b; Pokk et al., 1995; Griebel et al., 1996a).

* Toposcópio: GEA – 841, KLD Biosistemas.

Os pontos aleatórios invariavelmente refletiram uma condição de alta impedância, visto que acupontos apresentam baixa impedância (Bastos, 1993).

O grupo de tratamento D foi composto de animais que foram previamente tratados com acupuntura e posteriormente (30 minutos) submetidos à administração de antagonista seletivo dos receptores opióides, no caso naloxona, na dose de 10 mg/kg. Os animais foram testados no LEC após 15 minutos (Rodgers et al., 1984; Agmo et al., 1995; Belzung et al., 1997a; Belzung et al., 1997b; Belzung et al., 1998).

O grupo de tratamento E foi constituído por camundongos que foram submetidos a administração de antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}, (S)-WAY 100135, na dose de 10 mg/kg e, testados no LEC após 20 minutos (Rodgers et al., 1994d; Da Rocha et al., 1997;).

O grupo de tratamento F foi submetido à aplicação de agonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}, o 8-OH-DPAT, na dose de 3 mg/kg e, testados no LEC após 5 minutos (Evenden et al., 1990; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1994a; Griebel et al., 1995; Kitamura et al., 1996; Yamada et al., 1998).

O grupo de tratamento G submeteu-se à administração de antagonista seletivo de receptores benzodiazepínicos/GABA_A, o flumazenil na dose de 2,0 mg/kg e, testados no LEC após 15 minutos (Broaden et al., 1988; Pokk et al., 1997; Nogueira et al., 1998).

O grupo de tratamento H foi composto por animais que receberam sistemicamente antagonista seletivo dos receptores opióides, no caso naloxona, na dose de 10 mg/kg. Os animais foram testados no LEC após 15 minutos (Rodgers et al., 1984; Agmo et al., 1995; Belzung et al., 1997a; Belzung et al., 1997b; Belzung et al., 1998).

O grupo de tratamento I foi composto de animais que foram previamente tratados com acupuntura e posteriormente (30 minutos) submetidos à administração de antagonista seletivo dos receptores benzodiazepínicos/GABA_A, o flumazenil, na dose de 2,0 mg/kg. Os animais foram testados no LEC após 15 minutos (Broaden et al., 1988; Pokk et al., 1997; Nogueira et al., 1998).

O grupo de tratamento J sujeitou-se a administração de um agonista seletivo do receptor 5-HT₃, o 2-Me-5-HT, na dose de 10mg/kg, sendo testados no LEC após 15 minutos (Artaiz et al., 1995).

O grupo de tratamento K submeteu-se à aplicação de ondansetron, um antagonista seletivo de receptor 5-HT₃, na dose de 0,1 mg/kg. Os animais foram testados no LEC após 20 minutos (Rodgers et al., 1995; Rodgers et al., 1997b; Cutler et al., 1997).

O grupo de tratamento L foi composto de animais que foram previamente tratados com naloxona, um antagonista seletivo dos receptores opióides, na dose de 10 mg/kg e posteriormente (30 minutos) submetidos à tratamento com acupuntura. Os animais foram testados no LEC após 15 minutos (Rodgers et al., 1984; Agmo et al., 1995; Belzung et al., 1997a; Belzung et al., 1997b; Belzung et al., 1998).

O grupo de tratamento M foi composto de animais que foram previamente tratados com flumazenil, um antagonista seletivo dos receptores benzodiazepínicos/GABA_A na dose de 2,0 mg/kg e posteriormente (30 minutos) submetidos à tratamento com acupuntura. Os animais foram testados no LEC após 15 minutos (Broaden et al., 1988; Pokk et al., 1997; Nogueira et al., 1998).

Todos os animais que não foram submetidos ao tratamento com acupuntura, foram agulhados com o mesmo material, em pontos aleatórios (excetuando-se os pontos localizados em meridianos conhecidos, e aqueles denominados extras), confirmados com o auxílio de um toposcópio*, pelo mesmo período de tempo, com um número idêntico e exatamente pela mesma parcela de vezes. Assim como, todos os camundongos sujeitos ao tratamento com acupuntura e o controle/salina sofreram administração de solução salina. (manipulação/veículo).

* Toposcópio: GEA – 841, KLD Biosistemas.

Os pontos aleatórios invariavelmente refletiram uma condição de alta impedância, visto que acupontos apresentam baixa impedância (Bastos, 1993).

Todos os camundongos foram submetidos a manipulação e/ou tratamentos somente no dia do teste, não sendo empregados por mais de uma vez.

Todos os compostos utilizados foram preparados no dia do teste.

Na administração dos compostos, que foram dissolvidos em solução salina isotônica com um constante volume total de 10 ml/kg, a via usada foi intraperitoneal (IP), exceto para o 8-OH-DPAT, cuja via foi subcutânea (SC).

6. RESULTADOS

Após as mensurações efetuadas na aplicação do teste de ansiedade, labirinto elevado em forma de cruz (LEC), as observações geradas pelas diversas unidades amostrais, submetidas aos distintos tratamentos, foram interpretadas, tabuladas e alocadas nas tabelas de contingência 10x17, que visam a edificação dos dois parâmetros tradicionais vinculados ao LEC, %no e %t. Dessa maneira, os resultados sumarizados, da disposição desses dados, encontram-se nas Tabelas, em anexo, enumeradas de 1 a 13, onde:

N^o – representa o número da unidade amostral;

(A) – representa o número de ingressos nos braços abertos;

(F) – representa o número de ingressos nos braços fechados;

(A+ F) – representa a somatória de **(A)** e **(F)**;

% n^o – representa um dos dois parâmetros tradicionais do LEC, o primeiro deles, cujo valor é alcançado quando aplica-se a fórmula – $(A)/(A+F) \times 100$;

t_A – representa o tempo despendido sobre os braços abertos;

t_F – representa o tempo despendido sobre os braços fechados;

t_A + t_F – representa a somatória de **t_A** e **t_F**;

t_C – representa o tempo despendido sobre a plataforma central e

% t – representa um dos dois parâmetros tradicionais do LEC, o segundo deles, cujo valor é alcançado quando aplica-se a fórmula – $t_A/300 \times 100$.

Tabela 14. GRUPOS DE TRATAMENTO (Somatória/Totais)

TRATAMENTOS													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A	76	92	128	59	121	117	71	95	102	67	136	65	73
F	138	94	87	115	129	111	124	166	112	141	115	111	85
t _A	856	1560	2372	878	1819	1469	977	1135	1469	1039	1653	960	1162
t _F	2111	1616	1407	2015	1743	1470	2015	2338	1686	1924	1408	1571	1320
t _C	1533	1324	721	1607	938	561	608	1027	445	637	539	469	518

Onde as letras na segunda linha de A a M representam os distintos tratamentos, que obedecem aqui à sua ordem de sorteio;

e na primeira coluna:

A – representa o número total de ingressos nos braços abertos;

F – representa o número total de ingressos nos braços fechados;

t_A – representa o tempo total despendido sobre os braços abertos;

t_F – representa o tempo total despendido sobre os braços fechados;

t_C – representa o tempo total despendido sobre a plataforma central;

É possível observar-se na Tabela 14, que os diversos tratamentos demonstraram comportamentos distintos entre si, quando confrontados com as principais observações granjeadas no LEC, que arquitetam os dois parâmetros %no e %t. Examinando de forma mais minuciosa essa tabela, verifica-se ainda no âmbito da Estatística Descritiva, que os animais dos grupos de tratamentos C, B, E, H, F, I e K, respectivamente, benzodiazepínico, acupuntura, (5)-Way 100135, naloxona, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, com escores de 128, 92, 121, 95, 117, 102 e 136, alcançaram uma somatória, quanto ao número de entradas nos ramos abertos do LEC, acima de 92, enquanto que os grupos de tratamentos A, D, J, G, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, 2-Me-5-HT, flumazenil, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, obtiveram valores totais igual ou menores do que 77 (76, 59, 67, 71, 65 e 73), perfazendo sete grupos de tratamento no primeiro caso e seis no segundo. Assim, desde que a média total da somatória do número de entradas nos ramos abertos dos 13 grupos de tratamento é igual a 92, verifica-se que os grupos representados pelos códigos C, B, E, H, F, I e K, localizam-se acima da média, enquanto que os grupos A, D, J, G, L e M, estão abaixo dela. É notório também que as expressões numéricas variaram desde 59 no grupo D (acupuntura/naloxona) até 136 no grupo K (ondansetron). Já relativamente aos ingressos nos braços fechados encontra-se uma média total da somatória desse número de entradas igual a 120, o que permite alocar os grupos de tratamento A, E, H, J e G, respectivamente, controle/salina, (5)-Way 100135, naloxona, 2-Me-5-HT e flumazenil, com valores absolutos (138, 129, 166, 141 e 124) que vão desde 124 (G – flumazenil) à 166 (H – naloxona), acima da média e, os grupos de tratamentos D, B, C, F, I, K, L e M, respectivamente, acupuntura/naloxona, acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, abaixo dela, exibindo números absolutos (115, 94, 87, 111, 112, 115, 111 e 85) que vão de 85 (M – flumazenil/acupuntura) até 115 (D e K, acupuntura/naloxona e ondansetron), totalizando cinco grupos de tratamento, no primeiro caso e oito no segundo.

Cotejando a observação tempo despendido sobre os braços abertos, pode-se examinar que o total de segundos associados à esse parâmetro também é diferente entre os vários grupos de tratamento. Assim, obtendo-se a média dos 13 tratamentos nesse quesito constatou-se um valor igual a 1334.54, onde situam-se acima dela os grupos B, C, E, F, I e K, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, com escores de 1560, 2372, 1819, 1469, 1469 e 1653, sendo que esses valores variaram de 1469 para os grupos F (8-OH-DPAT) e I (acupuntura/flumazenil) até 2372 para o grupo C (benzodiazepínico), enquanto que os grupos localizados abaixo dessa média foram A, D, G, H, J, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, com valores de 856, 878, 977, 1135, 1039, 960 e 1162 que oscilaram desde 856 do grupo A (controle/salina) até 1162 do grupo M (flumazenil/acupuntura). Nota-se nessa distribuição que seis grupos de tratamento apresentam-se acima da média ao passo que sete grupos permanecem abaixo dela. Na próxima linha dessa tabela, uma das observações que constroem o parâmetro %t, o tempo despendido sobre os braços fechados do LEC, é digno de nota a verificação da variação dos valores distribuídos entre os diversos grupos de tratamento, que vai de 1320 no grupo M (flumazenil/acupuntura) até 2338 no grupo H (naloxona), alcançando-se uma média de 1740.30. Assim, fica demonstrado que os seis grupos acima da média foram constituídos pelos A, D, E, G, H e J, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, com valores de 2111, 2015, 1743, 2015, 2338 e 1924, e os sete abaixo dela compostos pelos B, C, F, I, K, L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, com escores de 1616, 1407, 1470, 1686, 1408, 1571 e 1320. Na última linha dessa tabela pode-se observar um comportamento similar entre os vários grupos de tratamento. Nesse caso temos valores que vão desde 445 no grupo I (acupuntura/flumazenil), alcançando 1533 no grupo A (controle/salina) e, gerando uma média de 840.54. Os grupos A, B, D, E e H,

respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135 e naloxona, com escores de 1533, 1324, 1607, 938 e 1027, conservaram-se acima da média, enquanto que os grupos C, F, G, I, J, K, L e M, respectivamente, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, com valores de 721, 561, 608, 445, 637, 539, 469 e 518, ficaram abaixo dela.

Tabela 15. GRUPOS DE TRATAMENTO (Valores expressos em média).

TRATAMENTOS													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A	5.07	6.13	8.53	3.93	8.07	9.75	5.92	6.33	8.50	5.58	11.33	6.50	7.30
F	9.20	6.27	5.80	7.67	8.60	9.25	10.33	11.07	9.33	11.75	9.58	11.10	8.50
t_A	57.07	104.00	158.13	58.53	121.27	122.42	81.42	75.67	122.42	86.58	137.75	96.00	116.20
t_F	140.73	107.73	93.80	134.33	116.20	122.50	167.92	155.87	140.50	160.33	117.33	157.10	132.00
t_C	102.20	88.27	48.07	107.13	62.53	46.75	50.67	68.47	37.08	53.08	44.92	46.90	51.80

Onde as letras na segunda linha de A a M representam os distintos tratamentos,

que obedecem aqui à sua ordem de sorteio;

e na primeira coluna:

A – representa a média total de ingressos nos braços abertos;

F – representa a média total de ingressos nos braços fechados;

t_A – representa a média do tempo total despendido sobre os braços abertos;

t_F – representa a média do tempo total despendido sobre os braços fechados;

t_C – representa a média do tempo total despendido sobre a plataforma central;

Na Tabela 15, da mesma maneira como ocorreu na Tabela 14, houve desigualdade na postura dos diversos grupos de tratamento, comparados desta feita, quanto à valores de média obtidos das principais observações verificadas na aplicação do LEC, que compõem a formação dos dois parâmetros %no e %t. Destarte, verifica-se que na observação referente ao número de entradas nos ramos abertos a média total obtida de todos os grupos de tratamento foi de 7.15, de modo, que situam-se acima dela os grupos C, E, F, I, K e M, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, apresentando valores que vão de 7.30 (M – flumazenil/acupuntura) à 11.33 (K – ondansetron) e abaixo, os grupos A, D, B, H, J, G e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, acupuntura, naloxona, 2-Me-5-HT, flumazenil e naloxona/acupuntura, exibindo valores compreendidos entre 3.93 (D – acupuntura/naloxona) e 6.50 (L – naloxona/acupuntura), abrangendo seis grupos acima da média e sete abaixo. Por outro lado, a média da somatória de todas as médias dos 13 tratamentos, associada ao número de ingressos nos ramos fechados, obtém-se um valor que alcança 9.33, gerando, portanto, seis grupos de tratamento situados acima dela, H, J, I, G, K e L, respectivamente, naloxona, 2-Me-5-HT, acupuntura/flumazenil, flumazenil, ondansetron e naloxona/acupuntura, com médias que vão de 9.33 (I – acupuntura/flumazenil) até 11.75 (J – 2-Me-5-HT) e sete grupos de tratamento localizados abaixo dela, constituídos por A, D, C, B, E, F e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, benzodiazepínico, acupuntura, (5)-way

100135, 8-OH-DPAT e flumazenil/acupuntura, com médias compreendidas entre 6.27 (B – acupuntura) e 9.25 (F – 8-OH-DPAT).

Já, confrontando a verificação acerca do tempo despendido sobre os ramos abertos, verifica-se que o total de segundos relacionados à essa observação também é desigual entre os diversos grupos de tratamentos. Portanto, constatou-se uma média de 102.88 vinculada aos 13 grupos de tratamentos, com valores que vão desde 57.07 no grupo A (controle/salina) até 158.13 do grupo C (benzodiazepínico). Dessa forma, situam-se acima da média os grupos B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, com valores de 104.00, 158.13, 121.27, 122.42, 122.42, 137.75 e 116.20, e abaixo dela os grupos A, D, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, com valores de 57.07, 58.53, 81.42, 75.67, 86.58 e 96.00. Portanto, houve sete grupos de tratamento acima da média e seis grupos abaixo. Na linha subsequente dessa tabela representada pelo tempo despendido sobre os braços fechados, foram obtidas médias por grupo de tratamento que variaram desde 93.80 no grupo C (benzodiazepínico) indo até 167.92 no grupo G (flumazenil), produzindo uma média entre grupos de 134.33. Os grupos de tratamento A, D, G, H, I, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-Ht e naloxona/acupuntura, com valores de 140.73, 134.33, 167.92, 155.87, 140.50, 160.33 e 157.10, obtiveram valores acima da média e, os grupos B, C, E, F, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, ondansetron e

flumazenil/acupuntura, alcançaram escores de, 107.73, 93.80, 116.20, 122.50, 117.33 e 132.00, que ficaram abaixo da média, perfazendo assim, sete grupos no primeiro caso e seis grupos no segundo. Finalmente, nessa tabela verifica-se outra variável observada, desta feita associada ao tempo despendido sobre a plataforma central do aparato, cujas médias dos grupos de tratamento oscilaram entre 37.08 do grupo I (acupuntura/flumazenil) e 107.13 do grupo D (acupuntura/naloxona), dando origem ao valor de 62.14 como média entre tratamentos. Assim, pode-se alocar cinco grupos acima dela, representados por A, B, D, E e H, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135 e naloxona, com valores de 102.20, 88.27, 107.13, 62.53 e 68.47, e oito situados abaixo da aludida média, C, F, G, I, J, K, L e M, respectivamente, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, com valores de 48.07, 46.75, 50.67, 37.08, 53.08, 44.92, 46.90 e 51.80.

Tabela 16. Primeiro parâmetro de observação (Seleção dos valores a serem analisados linearmente)

%no													
TRATAMENTOS													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	40.00	54.55	66.66	28.57	40.00	50.00	50.00	53.33	52.94	47.83	48.78	50.00	31.82
2	54.55	56.25	55.00	40.00	59.09	68.75	11.11	40.00	45.45	40.91	63.64	5.88	28.57
3	41.67	54.55	50.00	9.09	47.06	36.84	31.25	47.83	36.36	5.88	42.86	50.00	61.54
4	35.29	41.66	42.86	0.00	53.33	50.00	55.00	35.00	52.94	18.75	47.06	47.37	55.55
5	36.36	50.00	57.14	35.00	47.62	66.67	50.00	11.11	53.33	5.55	40.91	5.55	56.25
6	31.25	53.85	58.82	20.00	46.15	58.06	50.00	41.67	56.52	9.52	69.23	47.62	44.44
7	33.33	50.00	72.73	20.00	36.36	50.00	6.67	53.33	42.10	11.76	71.74	45.00	41.67
8	41.18	31.25	37.50	55.56	46.67	46.15	7.69	30.77	42.86	45.00	39.13	50.00	55.55
9	18.18	50.00	75.00	50.00	50.00	50.00	41.18	17.65	53.57	53.33	76.92	52.38	40.00
10	33.33	40.00	58.33	20.00	50.00	33.33	45.45	7.14	30.77	60.00	58.33	12.50	50.00
11	11.11	20.00	64.71	28.57	40.00	55.00	42.86	50.00	46.67	50.00	46.67		
12	20.00	33.33	41.18	50.00	70.59	47.37	33.33	40.00	50.00	50.00	45.83		
13	41.18	22.22	52.63	50.00	50.00			44.44					
14	37.50	45.45	76.47	28.57	41.18			47.62					
15	16.67	81.48	68.42	12.50	43.75			14.28					
X	32.77	45.64	58.50	29.86	48.12	51.01	35.38	35.61	46.96	33.21	54.26	36.63	46.54

Onde, %no, representa o primeiro parâmetro tradicional associado ao LEC e descreve a proporção total de entradas nos braços abertos expresso em percentagem;

Na terceira linha situam-se os diferentes tratamentos, que vão de **A** a **M**;

Na primeira coluna o **n** representa o tamanho da amostra de cada grupo de tratamento e

X representa a média total alcançada por cada grupo, expressa em percentagem.

Na Tabela 16 pode-se observar os escores percentuais alcançados por cada uma das unidades amostrais em cada um dos tratamentos, bem como o tamanho da amostra em cada um deles. Portanto, os números alocados na primeira coluna (n) desta tabela em particular, representam números de ordem e, não estão associados aos números que representam os animais individualmente. Os valores expressos nessa tabela representam a edificação do primeiro parâmetro de observação do LEC, proposto desde o início por Pellow e colaboradores em 1985, a %no. São esses percentuais específicos e individuais que irão compor a Análise de Variância acerca desse parâmetro. É possível constatar que diante de valores que variam entre 0 [por exemplo, o animal 4 (número de ordem, na verdade unidade amostral 14, ver Tabela 4) do tratamento D (acupuntura/naloxona)] e 81.48 % [por exemplo, o camundongo 15 (número de ordem, na verdade unidade amostral 60, ver Tabela 2) oriundo do tratamento B (acupuntura)] localizados entre os 13 grupos de tratamento, mantém-se obviamente uma ampla variabilidade, o que por si só, justifica esse procedimento inferencial estatístico. Além disso, pode-se ainda verificar a expressão da média atingida por cada um dos diversos tratamentos, cujos resultados serão analisados mais adiante.

Tabela 17. Segundo parâmetro de observação (Seleção dos valores a serem analisados linearmente)

%t													
TRATAMENTOS													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	16.33	21.67	69.67	18.67	30.67	3.67	41.67	45.67	40.00	39.00	42.00	39.33	28.00
2	48.67	52.67	43.33	49.00	52.67	57.33	14.33	34.33	17.00	27.33	41.67	8.33	24.67
3	28.00	29.00	65.00	1.33	41.33	35.33	19.33	41.00	34.33	16.67	25.33	30.00	53.33
4	26.33	31.33	26.00	0.00	52.67	51.33	37.67	22.00	45.33	19.67	44.33	44.00	39.00
5	21.33	38.00	41.67	19.00	43.00	51.33	42.67	6.00	60.00	13.33	38.67	10.00	37.00
6	11.67	32.00	52.67	4.67	33.33	55.33	44.00	26.33	47.00	6.67	62.67	42.00	37.33
7	26.00	21.33	71.00	3.33	21.00	36.33	10.67	26.66	37.00	10.00	72.00	40.00	37.00
8	26.00	29.67	12.00	42.67	38.00	37.00	8.67	19.00	25.67	35.00	36.00	42.33	56.00
9	11.33	25.67	74.67	39.33	64.00	42.00	27.00	4.33	48.00	31.00	64.67	52.67	39.00
10	11.67	33.33	64.00	7.33	39.67	29.00	24.00	15.00	27.67	52.00	42.00	11.33	36.00
11	4.67	41.67	49.33	12.67	43.67	51.67	34.67	36.67	56.67	48.67	42.33		
12	6.00	22.00	37.67	28.67	54.00	39.33	21.00	33.33	51.00	47.00	39.33		
13	20.33	40.67	40.33	42.00	29.33			21.67					
14	23.67	26.67	74.33	11.33	30.00			42.33					
15	3.33	74.33	69.00	12.67	33.00			4.00					
X	19.02	34.67	52.71	19.51	40.42	40.80	27.14	25.22	40.81	28.86	45.92	32.00	39.04

Onde, %t, representa o segundo parâmetro tradicional associado ao LEC e descreve a proporção total de tempo despendido sobre os braços abertos expresso em percentagem;

Na terceira linha situam-se os diferentes tratamentos, que vão de A a M;

Na primeira coluna o n representa o tamanho da amostra de cada grupo de tratamento e

X representa a média total alcançada por cada grupo, expressa em percentagem.

Na Tabela 17 verifica-se, da mesma forma como na Tabela 16, os valores percentuais atingidos por cada uma das unidades amostrais em cada um dos tratamentos, bem como o tamanho da amostra em cada um deles. Portanto, os números alocados na primeira coluna (n) desta tabela em particular, representam números de ordem e, não estão associados aos números que representam os animais individualmente. Os valores expressos nessa tabela representam a edificação do segundo parâmetro de observação do LEC, proposto desde o início por Pellow e colaboradores em 1985, a %t. São esses percentuais específicos e individuais que irão compor a Análise de Variância acerca desse parâmetro. É possível constatar que diante de valores que variam entre 0 [por exemplo, o animal 4 (número de ordem, na verdade unidade amostral 14, ver Tabela 4) do tratamento D (acupuntura/naloxona)] e 81.48 % [por exemplo, o camundongo 15 (número de ordem, na verdade unidade amostral 60, ver Tabela 2) oriundo do tratamento B (acupuntura)] localizados entre os 13 grupos de tratamento, mantém-se obviamente uma ampla variabilidade, o que por si só, justifica esse procedimento inferencial estatístico. Além disso, pode-se ainda verificar a expressão da média atingida por cada um dos diversos tratamentos, cujos resultados serão analisados mais adiante.

Deve-se ressaltar que os exemplos exibidos aqui, i.e., o animal com o número de ordem 4 nas Tabelas 17 e 18 (na realidade, no sorteio parcialmente sistemático recebeu o número, agora sim, individual e de entrada nos ensaios de 14, vide Tabela 4) pertencente ao grupo de tratamento D (acupuntura/naloxona) ostenta o zero absoluto (0 %), que nesse caso, trata-se de um zero estrutural, ou seja, é uma observação coerente e consistente, de fato, não ingressou nenhuma

vez em qualquer dos dois braços abertos do LEC, entrando apenas seis vezes nos ramos fechados, o que denota uma ínfima atividade exploratória. Aliás, corroborando com esses achados, observa-se que esse mesmo animal obviamente também não despendeu nenhum tempo sobre os braços abertos, já que não ingressou neles, não tendo igualmente produzido resultados diferentes de zero no parâmetro %t (ver Tabela 4). É inteiramente dispare, nas Tabelas 17 e 18, o comportamento do camundongo, número de ordem 15, sob o grupo de tratamento B (acupuntura), cujo número individual é o de 60 (ver Tabela 2).

Tabela 18. Médias de %no e %t dos diversos grupos de tratamentos.

TRATAMENTOS													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
%no	32.77	45.64	58.50	29.86	48.12	51.01	35.38	35.61	46.96	33.21	54.26	36.63	46.54
%t	19.02	34.67	52.71	19.51	40.42	40.80	27.14	25.22	40.81	28.86	45.92	32.00	39.04

Onde, está resumido os valores alcançados por cada grupo de tratamento;

Na segunda linha dessa tabela observa-se os diferentes grupos de tratamento de **A a M**;

Na primeira coluna estão alocados os dois únicos parâmetros tradicionais de observação na aplicação do LEC, % no e %t, expressos em valores de médias percentuais totais relativas à cada grupo.

Nesta Tabela 18, têm-se demonstrado, após metódica e ordenada edificação, os dois parâmetros de observação considerados clássicos e tradicionais na aplicação do modelo animal que trata da ansiedade: o LEC. Esses valores, na realidade, %no e %t, representam proporções, por essa razão, expressos em percentagem, fazem parte da Estatística Descritiva. Apesar, de até esse momento, não sofrerem procedimentos associados à Estatística Inferencial, evidenciam marcantes diferenças nos comportamentos dos distintos grupos de tratamento utilizados. Examinando-se atentamente essa tabela, pode-se inicialmente distinguir quais são os grupos de tratamento que se distanciam da média desses parâmetros, de que forma e com qual intensidade. Portanto, diante de um valor de média de 42.65 para a %no, pode-se situar os grupos **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, com valores de 45.64, 58.50, 48.12, 51.01, 46.96, 54.26 e 46.54, como estando acima desta média, ao passo que os grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, com escores de 32.77, 29.86, 35.38, 35.61, 33.21 e 36.63, como estando abaixo dela. Dessa maneira, embora existam valores que oscilam entre 29.86 no grupo D (acupuntura/naloxona) e 58.50 no grupo C (benzodiazepínico), têm-se sete grupos de tratamento localizados acima da média e seis grupos abaixo. No que tange o parâmetro %t, da mesma forma, manifesta-se claramente a desigualdade de postura dos diversos grupos de tratamento diante da média auferida de 34.31, onde é possível observar que sete grupos de

tratamento, representados por **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, localizam-se acima da média, com valores de 34.67, 52.71, 40.42, 40,80, 40.81, 45.92 e 39.04, sendo o menor de 19.02 do grupo A (controle/salina) e o maior de 52.71 do grupo C (benzodiazepínico), enquanto que seis grupos de tratamento situam-se abaixo da média, **A, D, G, H, J e L**, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, apresentando valores de 19.02, 19.51, 27.14, 25.22, 28.86 e 32.00.

É de bom alvitre, salientar com vigor, que na presença de ambas variáveis dependentes %no e %t, são os mesmos grupos de tratamento que se colocam acima da média de cada um deles, de modo específico e independente, bem como também são os mesmos grupos que se colocam abaixo dessa média. No primeiro caso citam-se os grupos **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, e no segundo os grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Tabela 19. Comparação entre os grupos de tratamento em relação as médias das observações e dos parâmetros do LEC.

OBSERVAÇÕES	MÉDIA		
	VALORES ABSOLUTOS	ACIMA DA MÉDIA	ABAIXO DA MÉDIA
A		CBEHFJK	ADJGLM
F		AEHJG	DBCFIKLM
t _A		BCEFIK	ADGHJLM
t _F		ADEGHJ	BCFIKLM
t _C		ABDEH	CFGIIKLM
VALORES PERCENTUAIS			
A		CEFIKM	ADBHJGL
F		HJIGKL	ADCBEFM
t _A		BCEFIKM	ADGHJL
t _F		EDGHIJL	BCEFKM
t _C		ABDEH	CFGIIKLM
	% no	BCEFIKM	ADGHJL
	%t	BCEFIKM	ADGHJL

Na Tabela 19., estão distribuídos os grupos de tratamento que deram a formatação de agrupamentos, que situam-se acima ou abaixo da média das observações de cada unidade amostral, diante de cada variável que compõem a edificação dos dois parâmetros tracionais do LEC, %no e %t, incluindo-os.

Em relação ao número de entradas nos braços abertos do LEC os grupos de tratamento C, B, E, H, F, I e K, respectivamente, benzodiazepínico, acupuntura, (5)-way 100135, naloxona, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, situaram-se acima da média, enquanto os grupos A, D, J, G, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, 2-Me-5-HT, flumazenil, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, ficaram abaixo dela. No caso dos ingressos nos ramos fechados, os grupos A E H J e G, respectivamente, controle/salina, (5)-way 100135, naloxona, 2-Me-5-HT e flumazenil, localizaram-se acima da média dessa variável, ao passo que os grupos, D B C F I K L e M, respectivamente, acupuntura/naloxona, acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, abaixo dela. Em referência ao tempo despendido sobre as ruelas abertas do LEC, os grupos de tratamento que foram alocados acima da média dessa variável foram B C E F I e K, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, sendo que os grupos A D G H J L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, localizaram-se abaixo dela. No quesito tempo despendido sobre os braços fechados, os grupos A D E G H e J,

respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, ficaram acima da média desse item, enquanto os grupos B C F I K L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, situaram-se abaixo dela. Considerando-se a variável tempo gasto sobre a plataforma central, os grupos de tratamento que foram alocados acima da média são, A B D E e H, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135 e naloxona, e abaixo dela são C F G I J K L e M, respectivamente, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura.

Quando as mesmas variáveis quantitativas são confrontadas com os diversos grupos de tratameto, desta feita, associando-se à valores percentuais, os resultados não diferem significativamente. Assim, em se tratando de entradas nos braços abertos do LEC, pode-se verificar que os grupos C E F I K e M, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, situam-se acima da média dessa variável, ao passo que os grupos A D B H J G e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, acupuntura, naloxona, 2-Me-5-HT, flumazenil e naloxona/acupuntura, localizam-se abaixo dela. No caso dos ingressos nos ramos fechados, têm-se os grupos H J I G K e L, respectivamente, naloxona, 2-Me-5-HT, acupuntura/flumazenil, flumazenil, ondansetron e naloxona/acupuntura, localizados acima da média e, os grupos A D C B E F e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, benzodiazepínico,

acupuntura, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT e flumazenil/acupuntura, abaixo dela. Quanto à variável tempo despendido sobre as ruelas abertas, encontram-se acima da média associada à essa variável, os grupos **B C E F I K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, e, abaixo dela, os grupos **A D G H J e L**, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura. Já concernente ao tempo gasto sobre os ramos fechados, os grupos de tratamento que alcançaram as maiores médias foram, **E D G H I J e L**, respectivamente, (5)-way 100135, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, enquanto as menores médias estão vinculadas aos grupos **B C E F K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, ondansetron e flumazenil/acupuntura. No item, tempo despendido na plataforma central, situam-se acima da média, os grupos **A B D E e H**, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135 e naloxona, e abaixo dessa média os grupos, **C F G I J K L e M**, respectivamente, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura.

Por fim, no que se refere aos dois parâmetros de observação do LEC, %no e %t, em ambos os casos, os conjuntos de grupos de tratamento estão constituídos pelos mesmos grupos, tanto acima da média que representa cada um desses parâmetros, nos grupos **B C E F I K e M**, como no caso de situarem-se abaixo dela, nos grupos **A D G H J e L**, ou seja, o comportamento dos diversos

grupos de tratamento deste estudo, associam-se similarmente uns aos outros, de maneira idêntica, quando confrontados com as médias dessas duas variáveis dependentes, acima e abaixo delas. Assim, os grupos de tratamento **B C E F I K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, contrapõem-se aos grupos **A D G H J e L**, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Tabela 20. Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação da variável %no.

GRUPO DE TRATAMENTO (CÓD.)	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
A	32.77	11.64	35.51
B	45.64	15.34	33.60
C	58.50	12.27	20.98
D	29.86	16.75	56.10
E	48.12	8.48	17.63
F	51.01	10.36	20.30
G	35.38	17.63	49.83
H	35.61	15.80	44.36
I	46.96	7.83	16.66
J	33.21	20.98	63.16
K	54.26	13.13	24.19
L	36.63	19.95	54.47
M	46.54	11.08	23.80

A partir da Tabela 20, inicia-se os procedimentos e técnicas associadas à Estatística Inferencial. Nesta tabela, expõe-se o valor médio, desvio padrão e coeficiente de variação do percentual referente ao primeiro parâmetro de observação do LEC, a variável dependente %no. O exame minucioso desta tabela revela que os maiores valores médios do percentual de %no entre os grupos de tratamento, que variou de 29.86% para o grupo D (acupuntura/naloxona) a 58.50% para o grupo C (benzodiazepínico), foi mais elevado nos grupos **C, K, F, E, I, M e B**, respectivamente, benzodiazepínico, ondansetron, 8-OH-DPAT, (5)-way 100135, acupuntura/flumazenil, flumazenil/acupuntura e acupuntura, com valores de 58.50%, 54.26%, 51,01%, 48.12%, 46.96% e 45.64% , que situaram-se acima da média geral de 42.99% e, as menores médias foram associadas aos grupos **A, L, H, G, J e D**, respectivamente, controle/salina, naloxona/acupuntura, naloxona, flumazenil, 2-Me-5-HT e acupuntura/naloxona, com valores de 32.77%, 36.63%, 35.61%, 35.38%, 33.21% e 29.86%, abaixo da média geral dos grupos. Quanto ao desvio padrão, os escores percentuais oscilaram entre 7.33% no grupo I (acupuntura/flumazenil) e 20.98% no grupo J (2-Me-5HT), sendo a média de 13.94%. Acima dessa média encontram-se os grupos B, D, G, H, J e L, respectivamente, acupuntura, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, com valores de 15.34, 16.75, 17.63, 15.80, 20.98 e 19.95, enquanto que abaixo dela os grupos A, C, E, F, I, K e M, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, com valores de 11.64, 12.27, 8.48, 10.36, 7.83, 13.13 e 11.08. O coeficiente de variação oscilou

de 16.66% para o grupo I (acupuntura/flumazenil) até 63.16% para o grupo J (2-Me-5-HT), indicando uma variabilidade reduzida até uma variabilidade razoável. Os escores que situam-se acima da média do coeficiente de variação para todos os grupos de tratamento de 37.00%, estão vinculados aos grupos **J, A, D, L, G e H**, respectivamente, 2-Me-5-HT, controle/salina, acupuntura/naloxona, naloxona/acupuntura, flumazenil e naloxona, com valores de 63.16%, 56.17%, 56.10%, 54.47%, 49.83% e 44.36%, enquanto que àqueles localizados abaixo dela encontram-se associados aos grupos **B, K, M, C, F, E e I**, respectivamente, acupuntura, ondansetron, flumazenil/acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, (5)-way 100135 e acupuntura/flumazenil, com valores de 33.60%, 24.19%, 23.80%, 20.98%, 20.30%, 17.63% e 16.66%. Assim, os grupos de tratamento **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura são àqueles que menos sofreram com a variação entre suas unidades amostrais.

Dessa tabela é possível deduzir que a diferença entre os valores médios dos grupos B (acupuntura) e C (benzodiazepínico) foi de 12,87%, mais elevada no grupo C e o valor médio do grupo B representou 71,8% do médio do grupo A (controle/salina).

Através do teste de Kruskal-Wallis comprova-se que existe pelo menos um dos grupos que difere dos demais ($p < 0,001$), o que basta para afirmar a existência de desigualdades entre os tratamentos.

Tabela 21. Média, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação da variável %t.

GRUPO DE TRATAMENTO (CÓD.)	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
A	19.02	11.76	61.81
B	34.67	13.95	40.23
C	52.71	19.06	36.16
D	19.51	16.67	85.45
E	40.42	11.57	28.62
F	40.80	14.80	36.28
G	27.14	12.75	46.99
H	25.22	13.80	54.71
I	40.81	13.00	31.87
J	28.86	15.74	54.55
K	45.92	13.47	29.33
L	32.00	16.23	50.73
M	39.04	10.19	26.12

Na Tabela 21, encontram-se o valor médio, desvio padrão e coeficiente de variação do percentual referente ao segundo parâmetro de observação do LEC, a variável dependente %t. O exame atento desta tabela revela que os maiores valores médios do percentual de %t entre os grupos de tratamento, que variou de 19.02% para o grupo A (controle/salina) a 52.71% para o grupo C (benzodiazepínico), foi mais elevado nos grupos B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, com valores de 34.67%, 52.71%, 40.42%, 40.80%, 40.81%, 45.92% e 39.04%, que situaram-se acima da média geral de 34.31% e, as menores médias foram associadas aos grupos A, D, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5HT e naloxona/acupuntura, com valores de 19.02%, 19.51%, 27.14%, 25.22%, 28.86% e 32.00%, abaixo da média geral dos grupos. Em relação ao desvio padrão, os escores percentuais oscilaram entre 10.19% no grupo M (flumazenil/acupuntura) e 19.06% no grupo C (benzodiazepínico), sendo a média de 14.07%. Acima dessa média encontram-se os grupos C, D, F, J e L, respectivamente, benzodiazepínico, acupuntura/naloxona, 8-OH-DPAT, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, com valores de 19.06%, 16.67%, 14.80%, 15.74%, e 16.23%, enquanto que abaixo dela os grupos A, B, E, G, H, I, K e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, (5)-way 100135, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, ondansetron, flumazenil/acupuntura, com valores de 11.76%, 13.95%, 11.57%, 12.75%, 13.80%, 13.00%, 13.47% e 10.19%. O coeficiente de variação obteve uma média de 44.83%, tendo valores que variaram de 26.12% (variabilidade reduzida) no grupo M (flumazenil/acupuntura) até

85.45% (variabilidade elevada) no grupo D (acupuntura/naloxona). Situaram-se acima dessa média os grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, com valores de 61.81%, 85.45%, 46.99%, 54.71%, 54.55% e 50.73%, enquanto que abaixo dela, os grupos **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, com os valores de 40.23%, 36.16%, 28.62%, 36.28%, 31.87%, 29.33% e 26.12%, denotando baixa variabilidade.

Dessa tabela é possível deduzir que a diferença entre os valores médios dos grupos B (acupuntura) e C (benzodiazepínico) foi de 18,04%, mais elevada no grupo C e o valor médio do grupo B representou 65,8% do médio do grupo A (controle/salina).

Através do teste de Kruskal-Wallis comprova-se que existe pelo menos um dos grupos que difere dos demais ($p < 0,001$), o que basta para afirmar a existência de desigualdades entre os tratamentos.

Tabela 22. Postos médios por grupo de tratamento para cada uma das variáveis dependentes, %no e %t.

GRUPO DE TRATAMENTO	% no	%t
A	48.37	40.70
B	93.50	82.77
C	133.60	131.40
D	51.27	47.97
E	96.93	105.73
F	111.12	108.21
G	66.96	65.96
H	64.23	60.37
I	98.58	107.12
J	67.12	71.71
K	113.25	119.38
L	75.75	85.35
M	97.45	97.90

Nesta Tabela 22., distribuem-se os postos médios de cada grupo de tratamento confrontados a cada uma das variáveis dependentes e tradicionais do LEC, %no e %t.

Em relação ao primeiro parâmetro de observação clássico do LEC, %no, o posto médio do grupo de tratamento A (controle/salina) alcançou o valor de 48.37; para o grupo B (acupuntura) o valor de 93.50; para o grupo C (benzodiazepínico) foi de 133.60; para o grupo D (acupuntura/naloxona) de 51.27; para o grupo E [(5)-way 100135] de 96.93; para o grupo F (8-OH-DPAT) de 111.12; para o grupo G (flumazenil) de 66.96; para o grupo H (naloxona) de 64.23; para o grupo I (acupuntura/flumazenil) de 98.58; para o grupo J (2-Me-5-HT) de 67.12; para o grupo K (ondansetron) de 113.25; para o grupo L (naloxona/acupuntura) de 75.75 e para o grupo M (flumazenil/acupuntura) o valor de 97.45. Pode-se observar que para essa variável os valores do posto médio oscilaram de 48.37 no grupo A (controle/salina) até 133.60 no grupo C (benzodiazepínico). Os grupos de tratamento que atingiram os valores mais altos são, **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que os mais baixos situam-se nos grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Em relação ao segundo parâmetro de observação clássico do LEC, %t, o posto médio do grupo de tratamento A (controle/salina) alcançou o valor de 40.70; para o grupo B (acupuntura) o valor de 82.77; para o grupo C (benzodiazepínico)

Nesta Tabela 22., distribuem-se os postos médios de cada grupo de tratamento confrontados a cada uma das variáveis dependentes e tradicionais do LEC, %no e %t.

Em relação ao primeiro parâmetro de observação clássico do LEC, %no, o posto médio do grupo de tratamento A (controle/salina) alcançou o valor de 48.37; para o grupo B (acupuntura) o valor de 93.50; para o grupo C (benzodiazepínico) foi de 133.60; para o grupo D (acupuntura/naloxona) de 51.27; para o grupo E [(5)-way 100135] de 96.93; para o grupo F (8-OH-DPAT) de 111.12; para o grupo G (flumazenil) de 66.96; para o grupo H (naloxona) de 64.23; para o grupo I (acupuntura/flumazenil) de 98.58; para o grupo J (2-Me-5-HT) de 67.12; para o grupo K (ondansetron) de 113.25; para o grupo L (naloxona/acupuntura) de 75.75 e para o grupo M (flumazenil/acupuntura) o valor de 97.45. Pode-se observar que para essa variável os valores do posto médio oscilaram de 48.37 no grupo A (controle/salina) até 133.60 no grupo C (benzodiazepínico). Os grupos de tratamento que atingiram os valores mais altos são, **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que os mais baixos situam-se nos grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Em relação ao segundo parâmetro de observação clássico do LEC, %t, o posto médio do grupo de tratamento A (controle/salina) alcançou o valor de 40.70; para o grupo B (acupuntura) o valor de 82.77; para o grupo C (benzodiazepínico)

foi de 131.40; para o grupo D (acupuntura/naloxona) de 47.97; para o grupo E [(5)-way 100135] de 105.73; para o grupo F (8-OH-DPAT) de 108.21; para o grupo G (flumazenil) de 65.96; para o grupo H (naloxona) de 60.37; para o grupo I (acupuntura/flumazenil) de 107.12; para o grupo J (2-Me-5-HT) de 71.71; para o grupo K (ondansetron) de 119.38; para o grupo L (naloxona/acupuntura) de 85.35 e para o grupo M (flumazenil/acupuntura) o valor de 97.90. Pode-se observar que para essa variável os valores do posto médio oscilaram de 40.70 no grupo A (controle/salina) até 131.40 no grupo C (benzodiazepínico). Os grupos de tratamento que atingiram os valores mais altos são, **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que os mais baixos situam-se nos grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Verifica-se novamente, do mesmo modo como foi observado nas tabelas anteriores, a formação de dois conjuntos que são opostos, representados pelos grupos **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, e, **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Tabela 23. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento A).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
A	C	-53.361	-70.589	-36.132	***
A	K	-49.125	-67.399	-30.851	***
A	F	-45.880	-64.154	-27.606	***
A	E	-43.174	-60.402	-25.946	***
A	I	-41.826	-60.099	-23.552	***
A	M	-41.806	-61.068	-22.544	***
A	B	-40.504	-57.732	-23.276	***
A	L	-31.497	-50.759	-12.235	***
A	H	-30.478	-47.706	-13.250	***
A	G	-30.245	-48.519	-11.971	***
A	J	-28.078	-46.351	-9.804	***
A	D	-24.723	-41.952	-7.495	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

A partir da Tabela 23., até a Tabela 48., estão distribuídos os resultados da aplicação do Teste de Tukey Studentizado, um procedimento não paramétrico de comparação pareada, realizado com todos os 13 grupos de tratamento, um de cada vez, indicando inclusive, os valores do intervalo entre os limites de confiança de 95%. Esses processos foram executados para se verificar a significância ou não das duas variáveis dependentes e tradicionais do LEC, %no e %t, individualmente.

No intuito de ser pragmático, e visando a economia de uma superabundância na apresentação, associada à resultados sem significância estatística, nessas próximas tabelas, serão expostos unicamente os resultados que possuem tal requisito, i.e., àqueles significativos e passíveis de discussão.

Iniciando-se a aplicação dessa técnica estatística de comparações pareadas, contempla-se primeiramente o parâmetro de observação %no. Na Tabela 23., o grupo de tratamento A (controle/salina) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que a totalidade desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma desigualdade entre médias de -53.361 , existente no intervalo dos valores que vão de -70.589 a -36.132 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo K (ondansetron) com uma diferença entre médias de -49.125 , existente no intervalo entre -67.399 e -30.851 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo F (8-OH-DPAT) com uma

diferença entre médias de -45.880 , existente no intervalo entre -64.154 e -27.606 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo E [(5)-way 100135] com uma diferença entre médias de -43.174 , existente no intervalo entre -60.402 e -25.946 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo I (acupuntura/flumazenil) com uma diferença entre médias de -41.826 , existente no intervalo entre -60.099 e -23.552 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo M (flumazenil/acupuntura) com uma diferença entre médias de -41.806 , existente no intervalo entre -61.068 e -22.544 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo B (acupuntura) com uma diferença entre médias de -40.504 , existente no intervalo entre -57.732 e -23.276 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo L (naloxona/acupuntura) com uma diferença entre médias de -31.497 , existente no intervalo entre -50.759 e -12.235 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo H (naloxona) com uma diferença entre médias de -30.478 , existente no intervalo entre -47.706 e -13.250 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo G (flumazenil) com uma diferença entre médias de -30.245 , existente no intervalo entre -48.519 e -11.971 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo J (2-Me-5-HT) com uma diferença entre médias de -28.078 , existente no intervalo entre -46.351 e -9.804 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e por último o grupo D (acupuntura/naloxona) com uma diferença entre médias de -24.723 , existente no

intervalo entre -41.952 e -7.495 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 24. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento B).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
B	C	-12.857	-30.085	4.372	
B	K	-8.621	-26.895	9.653	
B	F	-5.376	-23.650	12.898	
B	E	-2.670	-19.898	14.558	
B	I	-1.322	-19.595	16.952	
B	M	-1.302	-20.564	17.960	
B	L	9.007	-10.255	28.269	
B	H	10.026	-7.202	27.254	
B	G	10.259	-8.015	28.533	
B	J	12.427	-5.847	30.700	
B	D	15.781	-1.448	33.009	***
B	A	40.504	23.276	57.732	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 24., o grupo de tratamento B (acupuntura) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que apenas dois desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 15.781, existente no intervalo entre -1.448 e 33.009, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 40.504, existente no intervalo entre 23.276 e 57.732, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 25. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento C)

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
C	K	4.236	-14.038	22.509	
C	F	7.481	-10.793	25.754	
C	E	10.187	-7.042	27.415	
C	I	11.535	-6.739	29.808	
C	M	11.555	-7.707	30.817	
C	B	12.857	-4.372	30.085	
C	L	21.864	2.602	41.126	***
C	H	22.883	5.634	40.111	***
C	G	23.116	4.842	41.389	***
C	J	25.283	7.010	43.557	***
C	D	28.637	11.409	45.866	***
C	A	53.361	36.132	70.589	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 25., o grupo de tratamento C (benzodiazepínico) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que seis desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo L (naloxona/acupuntura), com uma diferença entre médias de 21.864, existente no intervalo entre 2.602 e 41.126, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo H (naloxona), com uma diferença entre médias de 22.883, existente no intervalo entre 5.654 e 40.111, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo G (flumazenil), com uma diferença entre médias de 23.116, existente no intervalo entre 4.842 e 41.389, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo J (2-Me-5-HT), com uma diferença entre médias de 25.283, existente no intervalo entre 7.010 e 43.557, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 28.637, existente no intervalo entre 11.409 e 45.866, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 53.361, existente no intervalo entre 36.132 e 70.589, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 26. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento D).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
D	C	-28.637	-45.866	-11.409	***
D	K	-24.402	-42.675	-6.128	***
D	F	-21.157	-39.430	-2.883	***
D	E	-18.451	-35.679	-1.222	***
D	I	-17.103	-35.376	1.171	
D	M	-17.082	-36.344	2.180	
D	B	-15.781	-33.009	1.448	***
D	L	-6.773	-26.035	12.489	
D	H	-5.755	-22.983	11.474	
D	G	-5.522	-23.795	12.752	
D	J	-3.354	-21.628	14.919	
D	A	24.723	7.495	41.952	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Tabela 26. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento D).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
D	C	-28.637	-45.866	-11.409	***
D	K	-24.402	-42.675	-6.128	***
D	F	-21.157	-39.430	-2.883	***
D	E	-18.451	-35.679	-1.222	***
D	I	-17.103	-35.376	1.171	
D	M	-17.082	-36.344	2.180	
D	B	-15.781	-33.009	1.448	***
D	L	-6.773	-26.035	12.489	
D	H	-5.755	-22.983	11.474	
D	G	-5.522	-23.795	12.752	
D	J	-3.354	-21.628	14.919	
D	A	24.723	7.495	41.952	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 26., o grupo de tratamento D (acupuntura/naloxona) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que seis desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -28.637 , existente no intervalo entre -45.866 e -11.409 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo K (ondansetron), com uma diferença entre médias de -24.402 , existente no intervalo entre -42.675 e -6.128 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo F (8-OH-DPAT), com uma diferença entre médias de -21.157 , existente no intervalo entre -39.430 e -2.883 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo E [(5)-way 100135], com uma diferença entre médias de -18.451 , existente no intervalo entre -35.679 e -1.222 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo B (acupuntura), com uma diferença entre médias de -15.781 , existente no intervalo entre -33.009 e 1.448 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 24.723 , existente no intervalo entre 7.495 e 41.952 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 27. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento E).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
E	C	-10.187	-27.415	7.042	
E	K	-5.951	-24.225	12.323	
E	F	-2.706	-20.980	15.568	
E	I	1.348	-16.925	19.622	
E	M	1.368	-17.894	20.630	
E	B	2.670	-14.558	19.898	
E	L	11.677	-7.585	30.939	
E	H	12.696	-4.532	29.924	
E	G	12.929	-5.345	31.203	
E	J	15.097	-3.177	33.370	
E	D	18.451	1.222	35.679	***
E	A	43.174	25.946	60.402	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 27., o grupo de tratamento E [(5)-way 100135] confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que apenas dois desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 18.451, existente no intervalo entre 1.222 e 35.679, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 43.174, existente no intervalo entre 25.946 e 60.402, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 28. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento F).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
F	C	-7.481	-25.754	10.793	
F	K	-3.245	-22.507	16.017	
F	E	2.706	-15.568	20.980	
F	I	4.054	-15.208	23.316	
F	M	4.074	-16.128	24.277	
F	B	5.376	-12.898	23.650	
F	L	14.383	-5.819	34.586	
F	H	15.402	-2.872	33.676	
F	G	15.635	-3.627	34.897	
F	J	17.802	-1.460	37.065	
F	D	21.157	2.883	39.430	***
F	A	45.880	27.606	64.154	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 28., o grupo de tratamento F (8-OH-DPAT) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que também apenas dois desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 21.157, existente no intervalo entre 2.883 e 39.430, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 45.880, existente no intervalo entre 27.606 e 64.154, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 29. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento G).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
G	C	-23.116	-41.389	-4.842	***
G	K	-18.880	-38.142	0.382	
G	F	-15.635	-34.897	3.627	
G	E	-12.929	-31.203	5.345	
G	I	-11.581	-30.843	7.681	
G	M	-11.561	-31.763	8.642	
G	B	-10.259	-28.533	8.015	
G	L	-1.252	-21.454	18.951	
G	H	-0.233	-18.507	18.041	
G	J	2.168	-17.095	21.430	
G	D	5.522	-12.752	23.795	
G	A	30.245	11.971	48.519	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 29., o grupo de tratamento G (flumazenil) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que somente dois desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -23.116 , existente no intervalo entre -41.389 e -4.842 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 30.245 , existente no intervalo entre 11.971 e 48.519 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 30. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento H).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
H	C	-22.883	-40.111	-5.654	***
H	K	-18.647	-36.921	-0.373	***
H	F	-15.402	-33.676	2.872	
H	E	-12.696	-29.924	4.532	
H	I	-11.348	-29.621	6.926	
H	M	-11.328	-30.590	7.934	
H	B	-10.026	-27.254	7.202	
H	L	-1.019	-20.281	18.243	
H	G	0.233	-18.041	18.507	
H	J	2.400	-15.873	20.674	
H	D	5.755	-11.474	22.983	
H	A	30.478	13.250	47.706	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 30., o grupo de tratamento H (naloxona) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que três desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -22.883 , existente no intervalo entre -40.111 e -5.654 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo K (ondansetron), com uma diferença entre médias de -18.647 , existente no intervalo entre -36.921 e -0.373 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 30.478 , existente no intervalo entre 13.250 e 47.706 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 31. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento I).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
I	C	-11.535	-29.808	6.739	
I	K	-7.299	-26.561	11.963	
I	F	-4.054	-23.316	15.208	
I	E	-1.348	-19.622	16.925	
I	M	0.020	-20.182	20.222	
I	B	1.322	-16.952	19.595	
I	L	10.329	-9.873	30.531	
I	H	11.348	-6.926	29.621	
I	G	11.581	-7.681	30.843	
I	J	13.748	-5.514	33.010	
I	D	17.103	-1.171	35.376	
I	A	41.826	23.552	60.099	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 31., o grupo de tratamento I (acupuntura/flumazenil) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que unicamente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 41.826, existente no intervalo entre 23.552 e 60.099, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 32. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento J).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
J	C	-25.283	-43.557	-7.010	***
J	K	-21.048	-40.310	-1.785	***
J	F	-17.802	-37.065	1.460	
J	E	-15.097	-33.370	3.177	
J	I	-13.748	-33.010	5.514	
J	M	-13.728	-33.930	6.474	
J	B	-12.427	-30.700	5.847	
J	L	-3.419	-23.621	16.783	
J	H	-2.400	-20.674	15.873	
J	G	-2.168	-21.430	17.095	
J	D	3.354	-14.919	21.628	
J	A	28.078	9.804	46.351	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 32., o grupo de tratamento J (2-Me-5-HT) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que apenas três desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -25.283 , existente no intervalo entre -43.557 e -7.010 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo K (ondansetron), com uma diferença entre médias de -21.048 , existente no intervalo entre -40.310 e -1.785 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 28.078 , existente no intervalo entre 9.804 e 46.351 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 33. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento K)

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
K	C	-4.236	22.509	14.038	
K	F	3.245	-16.017	22.507	
K	E	5.951	-12.323	24.225	
K	I	7.299	-11.963	26.561	
K	M	7.319	-12.883	27.522	
K	B	8.621	-9.653	26.895	
K	L	17.628	-2.574	37.831	
K	H	18.647	0.373	36.921	***
K	G	18.880	-0.382	38.142	
K	J	21.048	1.785	40.310	***
K	D	24.402	6.128	42.675	***
K	A	49.125	30.851	67.399	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 33., o grupo de tratamento K (ondansetron) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que quatro desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo H (naloxona), com uma diferença entre médias de 18.647, existente no intervalo entre 0.373 e 36.921, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo J (2-Me-5-HT), com uma diferença entre médias de 21.048, existente no intervalo entre 1.785 e 40.310, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 24.402, existente no intervalo entre 6.128 e 42.675, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 49.125, existente no intervalo entre 30.851 e 67.399, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 34. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento L).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
L	C	-21.864	-41.126	-2.602	***
L	K	-17.628	-37.831	2.574	
L	F	-14.383	-34.586	5.819	
L	E	-11.677	-30.939	7.585	
L	I	-10.329	-30.531	9.873	
L	M	-10.309	-31.409	10.791	
L	B	-9.007	-28.269	10.255	
L	H	1.019	-18.243	20.281	
L	G	1.252	-18.951	21.454	
L	J	3.419	-16.783	23.621	
L	D	6.773	-12.489	26.035	
L	A	31.497	12.235	50.759	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 34., o grupo de tratamento L (naloxona/acupuntura) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que somente dois desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -21.864 , existente no intervalo entre -41.126 e -2.602 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 31.497 , existente no intervalo entre 12.235 e 50.759 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 35. Teste de Tukey Studentizado para %no (Grupo de tratamento M).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
M	C	-11.555	-30.817	7.707	
M	K	-7.319	-27.522	12.883	
M	F	-4.074	-24.277	16.128	
M	E	-1.368	-20.630	17.894	
M	I	-0.020	-20.222	20.182	
M	B	1.302	-17.960	20.564	
M	L	10.309	-10.791	31.409	
M	H	11.328	-7.934	30.590	
M	G	11.561	-8.642	31.763	
M	J	13.728	-6.474	33.930	
M	D	17.082	-2.180	36.344	
M	A	41.806	22.544	61.068	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 35., o grupo de tratamento M (flumazenil/acupuntura) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que unicamente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 41.806, existente no intervalo entre 22.544 e 61.068, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 36. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento A).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
A	C	-29.321	-49.512	-9.129	***
A	K	-13.586	-35.002	7.830	***
A	F	-11.251	-32.667	10.165	***
A	I	-8.475	-29.891	12.941	
A	E	-8.092	-28.283	12.099	
A	M	-6.402	-28.977	16.172	
A	B	-6.375	-26.567	13.816	***
A	L	0.332	-22.243	22.906	
A	J	3.469	-17.947	24.885	
A	D	4.082	-16.109	24.273	
A	G	5.191	-16.225	26.607	
A	H	7.109	-13.082	27.301	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Dando prosseguimento a aplicação dessa técnica estatística de comparações pareadas, contempla-se a seguir o parâmetro de observação %t.

Na Tabela 36., o grupo de tratamento A (controle/salina) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que quatro desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -29.321 , existente no intervalo entre -49.512 e -9.129 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo K (ondansetron), com uma diferença entre médias de -13.586 , existente no intervalo entre -35.002 e 7.830 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo F (8-OH-DPAT), com uma diferença entre médias de -11.251 , existente no intervalo entre -32.667 e 10.165 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo B (acupuntura), com uma diferença entre médias de -6.375 , existente no intervalo entre -26.567 e 13.816 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 37. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento B).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
B	C	-22.945	-43.137	-2.754	***
B	K	-7.211	-28.627	14.205	
B	F	-4.876	-26.292	16.540	
B	I	-2.100	-23.516	19.316	
B	E	-1.717	-21.908	18.475	
B	M	-0.027	-22.601	22.547	
B	A	6.375	-13.816	26.567	***
B	L	6.707	-15.867	29.281	
B	J	9.844	-11.572	31.260	
B	D	10.457	-9.734	30.649	***
B	G	11.566	-9.850	32.982	
B	H	13.485	-6.707	33.676	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 37., o grupo de tratamento B (acupuntura) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que três desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -22.945 , existente no intervalo entre -43.137 e -2.754 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 6.365 , existente no intervalo entre -13.816 e 26.567 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 10.457 , existente no intervalo entre -9.734 e 30.649 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 38. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento C).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
C	K	15.735	-5.681	37.151	
C	F	18.070	-3.346	39.486	
C	I	20.846	-0.570	42.261	
C	E	21.229	1.037	41.420	***
C	M	22.918	0.344	45.493	***
C	B	22.945	2.754	43.137	***
C	A	29.321	9.129	49.512	***
C	L	29.652	7.078	52.227	***
C	J	32.790	11.374	54.206	***
C	D	33.403	13.211	53.594	***
C	G	34.511	13.095	55.927	***
C	H	36.430	16.239	56.621	***

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 38., o grupo de tratamento C (benzodiazepínico) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que nove desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo E [(5)-way 100135], com uma diferença entre médias de 21.229, existente no intervalo entre 1.037 e 41.420, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo M (flumazenil/acupuntura), com uma diferença entre médias de 22.918, existente no intervalo entre 0.344 e 45.493, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo B (acupuntura), com uma diferença entre médias de 22.945, existente no intervalo entre 2.754 e 43.137, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de 29.321, existente no intervalo entre 9.129 e 49.512, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo L (naloxona/acupuntura), com uma diferença entre médias de 29.652, existente no intervalo entre 7.078 e 52.227, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo J (2-Me-5-HT), com uma diferença entre médias de 32.790, existente no intervalo entre 11.374 e 54.206, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo D (acupuntura/naloxona), com uma diferença entre médias de 33.403, existente no intervalo entre 13.211 e 53.594, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo G (flumazenil), com uma diferença entre médias de 34.511, existente no intervalo entre 13.095 e 55.927, estabelecidos como sendo os limites de confiança

para 95% de acerto e o grupo H (naloxona), com uma diferença entre médias de 36.430, existente no intervalo entre 16.239 e 56.621, estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.



Tabela 39. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento D).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
D	C	-33.403	-53.594	-13.211	***
D	K	-17.668	-39.084	3.748	
D	F	-15.333	-36.749	6.083	
D	I	-12.557	-33.973	8.859	
D	E	-12.174	-32.365	8.017	
D	M	-10.484	-33.059	12.090	
D	B	-10.457	-30.649	9.734	***
D	A	-4.082	-24.273	16.109	***
D	L	-3.750	-26.325	18.824	
D	J	-0.613	-22.029	20.803	
D	G	1.109	-20.307	22.525	
D	H	3.027	-17.164	23.219	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 39., o grupo de tratamento D (acupuntura/naloxona) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que três desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -33.403 , existente no intervalo entre -53.594 e -13.211 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto; o grupo B (acupuntura), com uma diferença entre médias de -10.457 , existente no intervalo entre -30.649 e 9.734 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto e o grupo A (controle/salina), com uma diferença entre médias de -4.082 , existente no intervalo entre -24.273 e 16.109 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 40. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento E).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
E	C	-21.229	-41.420	-1.037	***
E	K	-5.494	-26.910	15.922	
E	F	-3.159	-24.575	18.257	
E	I	-0.383	-21.799	21.033	
E	M	1.690	-20.885	24.264	
E	B	1.717	-18.475	21.908	
E	A	8.092	-12.099	28.283	
E	L	8.424	-14.151	30.998	
E	J	11.561	-9.855	32.977	
E	D	12.174	-8.017	32.365	
E	G	13.283	-8.133	34.699	
E	H	15.201	-4.990	35.393	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 40., o grupo de tratamento E [(5)-way 100135] confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que unicamente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significante entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -21.229 , existente no intervalo entre -41.420 e -1.037 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 41. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento F).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)	
F	C	-18.070	-39.486	3.346
F	K	-2.335	-24.909	20.239
F	I	2.776	-19.799	25.350
F	E	3.159	-18.257	24.575
F	M	4.849	-18.828	28.525
F	B	4.876	-16.540	26.292
F	A	11.251	-10.165	32.667
F	L	11.583	-12.094	35.259
F	J	14.720	-7.854	37.294
F	D	15.333	-6.083	36.749
F	G	16.442	-6.133	39.016
F	H	18.360	-3.056	39.776

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 41., o grupo de tratamento F (8-OH-DPAT) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que nenhum desses cotejamentos são significantes estatisticamente.

Tabela 42. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento G).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
G	C	-34.511	-55.927	-13.095	***
G	K	-18.777	-41.351	3.798	
G	F	-16.442	-39.016	6.133	
G	I	-13.666	-36.240	8.909	
G	E	-13.283	-34.699	8.133	
G	M	-11.593	-35.269	12.083	
G	B	-11.566	-32.982	9.850	
G	A	-5.191	-26.607	16.225	
G	L	-4.859	-28.535	18.817	
G	J	-1.722	-24.296	20.853	
G	D	-1.109	-22.525	20.307	
G	H	1.919	-19.497	23.335	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 42., o grupo de tratamento G (acupuntura/naloxona) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que somente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -34.511 , existente no intervalo entre -55.927 e -13.095 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 43. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento H).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
H	C	-36.430	-56.621	-16.239	***
H	K	-20.695	-42.111	0.721	
H	F	-18.360	-39.776	3.056	
H	I	-15.585	-37.000	5.831	
H	E	-15.201	-35.393	4.990	
H	M	-13.512	-36.086	9.063	
H	B	-13.485	-33.676	6.707	
H	A	-7.109	-27.301	13.082	
H	L	-6.778	-29.352	15.797	
H	J	-3.640	-25.056	17.776	
H	D	-3.027	-23.219	17.164	
H	G	-1.919	-23.335	19.497	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 43., o grupo de tratamento H (acupuntura/naloxona) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que unicamente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -36.430 , existente no intervalo entre -56.621 e -16.239 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 44. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento I).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
I	C	-20.846	-42.261	0.570	
I	K	-5.111	-27.685	17.464	
I	F	-2.776	-25.350	19.799	
I	E	0.383	-21.033	21.799	
I	M	2.073	-21.603	25.749	
I	B	2.100	-19.316	23.516	
I	A	8.475	-12.941	29.891	
I	L	8.807	-14.869	32.483	
I	J	11.944	-10.630	34.519	
I	D	12.557	-8.859	33.973	
I	G	13.666	-8.909	36.240	
I	H	15.585	-5.831	37.000	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 44., o grupo de tratamento I (acupuntura/flumazenil) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que nenhum desses cotejamentos são significantes estatisticamente.

Tabela 45. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento J).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
J	C	-32.790	-54.206	-11.374	***
J	K	-17.055	-39.629	5.519	
J	F	-14.720	-37.294	7.854	
J	I	-11.944	-34.519	10.630	
J	E	-11.561	-32.977	9.855	
J	M	-9.871	-33.548	13.805	
J	B	-9.844	-31.260	11.572	
J	A	-3.469	-24.885	17.947	
J	L	-3.137	-26.814	20.539	
J	D	0.613	-20.803	22.029	
J	G	1.722	-20.853	24.296	
J	H	3.640	-17.776	25.056	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 45., o grupo de tratamento J (2-Me-5-HT) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que somente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -32.790 , existente no intervalo entre -54.206 e -11.374 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 46. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento K).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)	
K	C	-15.735	-37.151	5.681
K	F	2.335	-20.239	24.909
K	I	5.111	-17.464	27.685
K	E	5.494	-15.922	26.910
K	M	7.184	-16.493	30.860
K	B	7.211	-14.205	28.627
K	A	13.586	-7.830	35.002
K	L	13.918	-9.759	37.594
K	J	17.055	-5.519	39.629
K	D	17.668	-3.748	39.084
K	G	18.777	-3.798	41.351
K	H	20.695	-0.721	42.111

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 46., o grupo de tratamento K (ondansetron) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que nenhum desses cotejamentos são significantes estatisticamente.

Tabela 47. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento L).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
L	C	-29.652	-52.227	-7.078	***
L	K	-13.918	-37.594	9.759	
L	F	-11.583	-35.259	12.094	
L	I	-8.807	-32.483	14.869	
L	E	-8.424	-30.998	14.151	
L	M	-6.734	-31.463	17.995	
L	B	-6.707	-29.281	15.867	
L	A	-0.332	-22.906	22.243	
L	J	3.137	-20.539	26.814	
L	D	3.750	-18.824	26.325	
L	G	4.859	-18.817	28.535	
L	H	6.778	-15.797	29.352	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 47., o grupo de tratamento L (naloxona/acupuntura) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que somente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -29.652 , existente no intervalo entre -52.227 e -7.078 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 48. Teste de Tukey Studentizado para %t (Grupo de tratamento M).

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS		DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	INTERVALO ENTRE OS LIMITES DE CONFIANÇA (95%)		
M	C	-22.918	-45.493	-0.344	***
M	K	-7.184	-30.860	16.493	
M	F	-4.849	-28.525	18.828	
M	I	-2.073	-25.749	21.603	
M	E	-1.690	-24.264	20.885	
M	B	0.027	-22.547	22.601	
M	A	6.402	-16.172	28.977	
M	L	6.734	-17.995	31.463	
M	J	9.871	-13.805	33.548	
M	D	10.484	-12.090	33.059	
M	G	11.593	-12.083	35.269	
M	H	13.512	-9.063	36.086	

As comparações significantes entre grupos ($p < 0.05$) são indicadas por ***.

Na Tabela 48., o grupo de tratamento M (flumazenil/acupuntura) confronta-se com os demais grupos de tratamento, um por um, até perfazer o total de 12 comparações pareadas. Pode-se verificar que somente um desses cotejamentos são significantes estatisticamente. Desse modo, demonstra-se uma diferença significativa entre este grupo e, o grupo C (benzodiazepínico), com uma diferença entre médias de -22.918 , existente no intervalo entre -45.493 e -0.344 , estabelecidos como sendo os limites de confiança para 95% de acerto.

Tabela 49. Resultados sumarizados dos testes comparativos entre os pares de grupos de tratamento para o parâmetro de observação %n0.

	A													
A		B												
B	*		C											
C	*	*		D										
D	Ns	*	*		E									
E	*	Ns	*	*		F								
F	*	Ns	Ns	*	Ns		G							
G	Ns	Ns	*	Ns	Ns	*		H						
H	Ns	Ns	*	Ns	*	*	Ns		I					
I	*	Ns	*	*	Ns	Ns	Ns	Ns		J				
J	Ns	Ns	*	Ns	Ns	*	Ns	Ns	Ns		K			
K	*	Ns	Ns	*	Ns	Ns	*	*	Ns	*		L		
L	Ns	Ns	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	*		M	
M	*	Ns	*	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns		

(*) – Diferença significativa entre os grupos indicados.

(Ns) – Diferença significativa não comprovada.

Na Tabela 49., estão resumidos os resultados das comparações entre os diversos grupos de tratamento entre si, expressos aos pares, tendo em vista o primeiro parâmetro de observação tradicional do LEC, a %no.

Estudando-se atentamente essa tabela, pode-se verificar que existe diferença significativa em relação ao grupo de tratamento A (controle/salina) com: os grupos, **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que não há diferença significativa comprovada para os grupos: **D, G, H, J e L**, respectivamente, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura. Da mesma forma, existe diferença significativa em relação ao grupo de tratamento B (acupuntura) com: os grupos, A, C, e D, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico e acupuntura/naloxona, enquanto que não há diferença significativa comprovada para os grupos: E, F, G, H, I, J, K, L e M, respectivamente, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. Com o grupo C (benzodiazepínico) pode-se visualizar diferença significativa estabelecida com os grupos, A, B, D, E, G, H, I, J, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, ao passo que diferença significativa não comprovada relacionam-se com os grupos, F e K, respectivamente, 8-OH-DPAT e ondansetron. O grupo de tratamento D (acupuntura/naloxona) determina diferença significativa com os grupos, B, C, E, F, I, K e M, respectivamente,

acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que não há diferença significativa comprovada para os grupos, A, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura. Já com referência ao grupo E [(5)-way 100135], este mantém diferença significativa com os grupos, A, C, D e H, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico, acupuntura/naloxona e naloxona, e não sustenta diferença significativa comprovada para os grupos, B, F, G, I, J, K, L e M, respectivamente, acupuntura, 8-OH-DPAT, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento F (8-OH-DPAT) têm diferença significativa com os grupos, A, D, G, H e J, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, B, C, E, I, K, L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento G (flumazenil) têm diferença significativa com os grupos, C, F e K, respectivamente, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT e ondansetron, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, E, H, I, J, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento H (naloxona) têm diferença significativa com os grupos, C, E, F e K, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT e ondansetron, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, G, I, J, L



e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento I (acupuntura/flumazenil) têm diferença significativa com os grupos, A, C, e D, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico e acupuntura/naloxona, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, B, E, F, G, H, J, K, L e M, respectivamente, acupuntura, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento J (2-Me-5-HT) têm diferença significativa com os grupos, C, F e K, respectivamente, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT e ondansetron, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, E, G, H, I, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento K (ondansetron) têm diferença significativa com os grupos, A, D, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, B, C, E, F, I e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento L (naloxona/acupuntura) têm diferença significativa com os grupos, C e K, respectivamente, benzodiazepínico e ondansetron, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, E, F, G, H, I, J e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT e

flumazenil/acupuntura. E, finalmente, o grupo de tratamento M (flumazenil/acupuntura), mantém diferença significativa com os seguintes grupos, A, C e D, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico e acupuntura/naloxona, enquanto que com os grupos, B, E, F, G, H, I, J, K e L, respectivamente, acupuntura, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron e naloxona/acupuntura, não guardam laços de diferença significativa comprovada.

Tabela 50. Resultados sumarizados dos testes comparativos entre os pares de grupos de tratamento para o parâmetro de observação %t.

	A													
A		B												
B	*		C											
C	*	*		D										
D	Ns	*	*		E									
E	*	Ns	Ns	*		F								
F	*	Ns	Ns	*	Ns		G							
G	Ns	Ns	*	Ns	*	*		H						
H	Ns	Ns	*	Ns	*	*	Ns		I					
I	*	Ns	Ns	*	Ns	Ns	*	*		J				
J	Ns	Ns	*	Ns	*	*	Ns	Ns	*		K			
K	*	*	Ns	*	Ns	Ns	*	*	Ns	*		L		
L	Ns	Ns	*	*	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns		M	
M	*	Ns	Ns	*	Ns	Ns	Ns	*	Ns	Ns	Ns	Ns		

(*) – Diferença significativa entre os grupos indicados.

(Ns) – Diferença significativa não comprovada.

Na Tabela 50., estão resumidos os resultados das comparações entre os diversos grupos de tratamento entre si, expressos aos pares, tendo em vista o segundo parâmetro de observação tradicional do LEC, a %t.

Estudando-se atentamente essa tabela, pode-se verificar que existe diferença significativa em relação ao grupo de tratamento A (controle/salina) com: os grupos, B, C, E, F, I, K, e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que não há diferença significativa comprovada para os grupos: D, G, H, J e L, respectivamente, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura . Da mesma forma, existe diferença significativa em relação ao grupo de tratamento B (acupuntura) com: os grupos, A, C, D e K, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico e acupuntura/naloxona e ondansetron, enquanto que não há diferença significativa comprovada para os grupos: E, F, G, H, I, J, L e M, respectivamente, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. Com o grupo C (benzodiazepínico) pode-se visualizar diferença significativa estabelecida com os grupos, A, B, D, G, H, J, e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, ao passo que diferença significativa não comprovada relacionam-se com os grupos, E, F, I, K e M, respectivamente, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento D

(acupuntura/naloxona) determina diferença significativa com os grupos, B, C, E, F, I, K, L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, enquanto que não há diferença significativa comprovada para os grupos, A, G, H, e J, respectivamente, controle/salina, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT. Já com referência ao grupo E [(5)-way 100135], este mantém diferença significativa com os grupos, A, D, G, H e J, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, e não sustenta diferença significativa comprovada para os grupos, B, C, F, I, K, L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento F (8-OH-DPAT) têm diferença significativa com os grupos, A, D, G, H e J, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, B, C, E, I, K, L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, acupuntura/flumazenil, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento G (flumazenil) têm diferença significativa com os grupos, C, E, F, I e K, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, H, J, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, naloxona, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura.

O grupo de tratamento H (naloxona) têm diferença significativa com os grupos, C, E, F, I, K e M, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, G, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, flumazenil, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura. O grupo de tratamento I (acupuntura/flumazenil) têm diferença significativa com os grupos, A, D, G, H e J, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, B, C, E, F, K, L e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, ondansetron, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento J (2-Me-5-HT) têm diferença significativa com os grupos, C, E, F, I e K, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, e ondansetron, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, A, B, D, G, H, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura. O grupo de tratamento K (ondansetron) têm diferença significativa com os grupos, A, B, D, G, H e J, respectivamente, controle/salina, acupuntura, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona e 2-Me-5-HT, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, C, E, F, I, L e M, respectivamente, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura.

O grupo de tratamento L (naloxona/acupuntura) têm diferença significativa com os grupos, C e D, respectivamente, controle/salina, benzodiazepínico e acupuntura/naloxona, e não possui diferença significativa comprovada para os grupos, L, B, E, F, G, H, I, J, K e M, respectivamente, naloxona/acupuntura, acupuntura, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, naloxona, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron e flumazenil/acupuntura. E, finalmente, o grupo de tratamento M (flumazenil/acupuntura), mantém diferença significativa com os seguintes grupos, A, D e H, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona e naloxona, enquanto que com os grupos, B, C, E, F, G, I, J, K e L, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, flumazenil, acupuntura/flumazenil, 2-Me-5-HT, ondansetron e naloxona/acupuntura, não guardam laços de diferença significativa comprovada.

Tabela 51. Comparações dos diversos grupos de tratamentos com o grupo controle, para %no e %t.

		TRATAMENTOS											
		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A	%no	*	*	Ns	*	*	Ns	Ns	*	Ns	*	Ns	*
A	%t	*	*	Ns	*	*	Ns	Ns	*	Ns	*	Ns	*

(*) – Diferença significativa entre os grupos indicados.

(Ns) – Diferença significativa não comprovada.

A – Grupo Controle/salina

A Tabela 51., demonstra os resultados das comparações dos diversos grupos de tratamento com o grupo controle/salina (A), diante dos dois parâmetros tradicionais do LEC, % no e %t.

O exame minucioso dessa tabela revela que, quanto ao primeiro parâmetro de observação do LEC, %no, houve diferença significativa entre o grupo controle/salina (A) e os grupos, B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que pode-se verificar que uma diferença significativa não comprovada, ocorreu com os grupos D, G, H, J, e L,

respectivamente, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Já, em relação ao segundo parâmetro de observação do LEC, %t, existe diferença significativa entre o grupo controle/salina (A) e os grupos, B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que pode-se verificar que uma diferença significativa não comprovada, ocorreu com os grupos D, G, H, J e L, respectivamente, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Tabela 52. Distribuição dos grupos de tratamento ansiolíticos.

TRATAMENTOS								
A	%no	B	C	E	F	I	K	M
A	%t	B	C	E	F	I	K	M

A – Grupo Controle/salina.

Na Tabela 52., que sumariza enfim, os resultados significativos do confronto entre o grupo controle/salina (A) e os grupos de tratamento ansiolíticos, tanto diante da variável %no, como da %t, observa-se com clareza, que os grupos de tratamento B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico,

(5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, e flumazenil/acupuntura, possuem comportamento ansiolítico em ambos parâmetros.

Tabela 53. Distribuição dos grupos de tratamento ansiogênicos.

TRATAMENTOS						
A	%no	D	G	H	J	L
A	%t	D	G	H	J	L

A – Grupo Controle/salina.

Na Tabela 53., que sumariza enfim, os resultados significativos do confronto entre o grupo controle/salina (A) e os grupos de tratamento ansiogênicos, tanto diante da variável %no, como da %t, observa-se com clareza, que os grupos de tratamento **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron, e flumazenil/acupuntura, possuem comportamento ansiogênico em ambos parâmetros.

Tabela 54. Diferenças entre os valores médios obtidos, associados aos grupos de tratamento acupuntura e benzodiazepínico.

PARÂMETRO	DIFERENÇA SIGNIFICANTE (%)
%no	12.87
%t	18.04

p < 0.001

Na Tabela 54., são exibidos os valores médios percentuais alcançados pelo grupo de tratamento acupuntura (B), quando confrontado com o grupo benzodiazepínico (C), no intuito de estabelecer uma **medida de eficiência** entre esses grupos. Desde que o grupo de tratamento benzodiazepínico (C) é considerado como droga-padrão do modelo animal que mensura a ansiedade Labirinto Elevado em forma de Cruz, a comparação desse grupo, como sendo um controle-positivo é pertinente e imprescindível. Assim, pode-se verificar que a diferença entre os valores médios dos grupos B e C, respectivamente, acupuntura e benzodiazepínico, foi de 12.87% para a variável dependente %no e, e 18.04% para a variável %t.

Tabela 55. Eficácia da acupuntura *versus* benzodiazepínicos.

PARÂMETRO	EFICÁCIA DA ACUPUNTURA (%)
%no	87.13
%t	81.60

p < 0.001

Observa-se na Tabela 55., que após determinada a diferença significativa entre os valores médios dos grupos B e C, respectivamente, acupuntura e benzodiazepínico, expressa em números percentuais, gera-se uma **medida de eficiência**, sendo o grupo C (benzodiazepínico) o ponto de referência-padrão do comportamento ansiolítico. Esses achados permitem deduzir que a eficácia do grupo B (acupuntura) em relação ao grupo C (benzodiazepínico), quanto ao parâmetro %no é de 87.13%, enquanto que para %t é de 81.60%.

7. DISCUSSÃO

As apreciações iniciais das deliberações decorrentes deste trabalho envolvem reflexões a respeito de alguns fatos extremamente relevantes. Em primeiro lugar, deve-se ressaltar a pequena quantidade de referências bibliográficas na literatura mundial, com alusão a acupuntura e qualquer modelo animal, espontâneo ou condicionante, de mensuração da ansiedade. Na realidade, na área associada ao estudo do comportamento, i e., na neurobiologia comportamental, até o presente momento, não se tem notícia de nenhuma publicação científica relacionada com a acupuntura.

Também devido a total escassez de material bibliográfico acerca da utilização da acupuntura em animais de laboratório, sobretudo nos camundongos, tanto a localização anatomotopográfica do acuponto usado C7, bem como a indicação terapêutica desse mesmo ponto sob uma ótica ansiolítica, ressentem-se de respaldo na literatura. No entanto, valendo-se de uma metodologia fundamentada em estruturas anatômicas descritas para o homem [Jiansan (sem data); Mann, 1982; Wen, 1985; Auteroche e Navaih, 1986; Bastos, 1993; Gomes et al., 1993; Maciocia, 1996], aliada ao emprego de um toposcópio*, que determina a baixa impedância tegumentar (Bastos, 1993), característica dos acupontos, de modo analógico, logrou-se alcançar sua localização.

* Toposcópio: GEA – 841, KLD Biosistemas.

Esse fato é corroborado principalmente porque o efeito ansiolítico verificado neste trabalho nos permite sugerir que realmente os sítios dos acupontos foram atingidos. Deve-se salientar que o acuponto extra Yin Tang já havia sido localizado no camundongo (Cole et al., 1994).

Dessa maneira, diante dos resultados obtidos nesta pesquisa e, sobretudo pelo seu ineditismo, sugere-se a seguinte localização anatômica do acuponto C7 no camundongo *Mus musculus* “albino suíço”: o acuponto C7 localiza-se no lado radial do tendão do músculo flexor cubital do carpo.

Outra questão de destaque refere-se ao tratamento concedido ao grupo C (benzodiazepínico), considerado pela maioria dos autores (Rodgers et al., 1997a) como um “padrão” nas mensurações ocorridas no LEC, sendo, portanto, denominado controle positivo. Por conseguinte, a determinação das comparações **entre-grupos** foi enfocada não somente com os diversos grupos de tratamento e o grupo controle/salina (comportamento basal), mas também especificamente com o grupo diazepam e o acupuntura.

Nas tabelas de números 1 a 13, encontram-se distribuídos todos os grupos de tratamento utilizados nesse trabalho, i.e., o grupo controle/salina, grupo acupuntura, grupo benzodiazepínico, grupo acupuntura/naloxona, grupo (5)-Way 100135, grupo 8-OH-DPAT, grupo flumazenil, grupo naloxona, grupo acupuntura/flumazenil, grupo 2-Me-5-HT, grupo ondansetron, grupo naloxona/acupuntura e, finalmente, grupo flumazenil/acupuntura. O conjunto desses grupos de tratamento acham-se classificados sob códigos alfabéticos, respectivamente de A à M, oriundos da aplicação de uma técnica estatística

denominada de Sorteio Sistemático, onde é sorteado um grupo de tratamento entre os 13 grupos, depois sorteado mais um e, assim subseqüentemente até o último, randomizando assim os diversos grupos. O resultado foi a seqüência: A, D, C, B, E, H, F, J, I, G, K, L e M que foi, posteriormente, após a execução dos ensaios experimentais, para efeito de apresentação, ordenada em A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L e M. Esse procedimento, além de tornar a sucessão dos grupos aleatória, permitiu, depois de realizados os estudos comportamentais com os 13 grupos de tratamento, que a interpretação dos resultados, i.e., a elaboração e alocação dos dados obtidos com a aplicação do modelo animal associado à mensuração da ansiedade, o Labirinto Elevado em forma de Cruz (LEC), pudesse edificar as tabelas de 1 a 13, de modo duplo-cego, desde que o indivíduo treinado para isso, desconhecia o teor dos aludidos grupos de tratamento, tendo informação unicamente de seus códigos alfabéticos, não interferindo, portanto, na sua interpretação. Outro atributo associado à essa randomização, provém do fato de que os diversos grupos de tratamento adentram no processo seqüencial vinculado aos experimentos efetuados, também de modo aleatório. Assim, iniciou-se essa pesquisa com o grupo de tratamento A, seguido do D, C, B, E, H, F, J, I, G, K, L e por fim o M. Deve-se ressaltar aqui, que igualmente, os animais, que constituem as unidades amostrais, sofreram uma randomização, desde que as caixas onde estavam alocados os camundongos, submeteram-se a um sorteio, no intuito de ordenar o ingresso desses animais nos distintos grupos de tratamento. Destarte, devido a essa metodologia, as unidades amostrais deram entrada nos vários grupos de tratamento sorteados, de maneira sistemática, de forma que o animal número 1 foi admitido no grupo de tratamento A, o próximo no grupo C e,

assim sucessivamente até o último grupo, representado por M. Esse método faz com que, num mesmo momento, sejam realizados todos os tratamentos, i.e., garante uma uniformidade comportamental, associada ao horário do dia e, portanto, ao ciclo circadiano.

Estudando-se a Tabela 15., principia-se a investigação em busca de evidências que possam demonstrar indícios ansiolíticos observados nos comportamentos de alguns grupos de tratamento. Dessa maneira, os animais dos grupos de tratamentos C, B, E, H, F, I e K, respectivamente, benzodiazepínico, acupuntura, (5)-Way 100135, naloxona, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, alcançaram uma somatória, quanto ao número de entradas nos ramos abertos do LEC, acima de 92, enquanto que os grupos de tratamentos A, D, J, G, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, 2-Me-5-HT, flumazenil, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura, obtiveram valores totais igual ou menores do que 77. Desde que a média total da somatória do número de entradas nos ramos abertos dos 13 grupos de tratamento é igual a 92, verifica-se que os seis primeiros grupos situam-se acima da média e os seis outros grupos, abaixo dela.

Depreende-se desse fato, número de entradas nos braços abertos, uma variável de apoio na edificação do primeiro parâmetro do LEC (%no) que os grupos de tratamento C, B, E, H, F, I e K, se contrapõe aos grupos de tratamentos A, D, J, G, L e M, i.e., nota-se que ainda no início, já existe uma postura praticamente definida que aponta os grupos benzodiazepínico (C), acupuntura (B), [(5)-way 100135] (E), 8-OH-DPAT (F), acupuntura/flumazenil (I) e ondansetron (K) como manifestando indicações de caráter ansiolítico, já que distanciam-se do grupo controle/salina (A).

Levando-se em consideração o tempo despendido sobre os braços abertos, pode-se examinar que o total de segundos associados à esse parâmetro também é diferente entre os vários grupos de tratamento. Assim, obtendo-se a média dos 13 tratamentos

nesse quesito constatou-se um valor igual a 1334.54, onde situam-se acima dela os grupos B, C, E, F, I e K, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, enquanto que os grupos localizados abaixo dessa média foram A, D, G, H, J, L e M, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT, naloxona/acupuntura e flumazenil/acupuntura.

Mais uma vez, ponderando-se acerca de outra variável, base da construção do segundo parâmetro do LEC (%t), comprova-se que os grupos de tratamento, B, C, E, F, I e K, em contraposição a A, D, G, H, J, L e M, justificam evidências de comportamento ansiolítico, especialmente quando confrontados com o grupo controle/salina (A).

Portanto, os resultados encontrados na tabela 15, sugerem inicialmente que os grupos de tratamento B, C, E, F, I e K, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil e ondansetron, possuem postura ansiolítica.

O item, tempo gasto nas passarelas abertas do LEC, deparado na tabela 16, corrobora nessa assertiva, visto que os grupos de tratamento B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, situam-se acima da média e abaixo dela os grupos A, D, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura. Pode-se observar que aos grupos de tratamento anteriores se acrescentou o grupo M (flumazenil/acupuntura).

As tabelas 17 e 18 formam a base de dados que elaboram e constroem os dois tradicionais parâmetros de observação do LEC, %no e %t, expressos na tabela 19. Nesta última tabela têm-se demonstrado, após metódica e ordenada edificação, os dois parâmetros de observação considerados clássicos e tradicionais na aplicação do modelo

animal que trata da ansiedade: o LEC. Esses valores, na realidade, %no e %t, representam proporções, por essa razão, expressos em percentagem, fazem parte da Estatística Descritiva. Apesar, de até esse momento, não sofrerem procedimentos associados à Estatística Inferencial, evidenciam marcantes diferenças nos comportamentos dos distintos grupos de tratamento utilizados. Examinando-se atentamente essa tabela, pode-se inicialmente distinguir quais são os grupos de tratamento que se distanciam da média desses parâmetros, de que forma e com qual intensidade. Portanto, diante de um valor de média de 42.65 para a %no, pode-se situar os grupos B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, como estando acima desta média, ao passo que os grupos A, D, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura, como estando abaixo dela.

É de bom alvitre, salientar com vigor, que na presença de ambas variáveis dependentes %no e %t, são os mesmos grupos de tratamento que se colocam acima da média de cada um deles, de modo específico e independente, bem como também são os mesmos grupos que se colocam abaixo dessa média. No primeiro caso citam-se os grupos B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, e no segundo os grupos A, D, G, H, J e L, respectivamente, controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura.

Esses resultados comprovam, agora com clareza, mesmo antes da aplicação de técnicas estatísticas inferenciais, que os grupos de tratamento B, C, E, F, I, K e M, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, exibem comportamentos

francamente ansiolíticos, em particular, permanecendo distanciados do grupo controle/salina, ao qual se contrapõem, o que é veementemente enfatizado na tabela 20.

O estudo minucioso dos dados encontrados na tabela 21, doravante submetidos à análise estatística inferencial, com um limite de confiança de acerto de 99%, onde expõe-se o valor médio, desvio padrão e coeficiente de variação, do percentual referente ao primeiro parâmetro de observação do LEC, a variável dependente %no, revela que os maiores valores médios do percentual de %no entre os grupos de tratamento, foi mais elevado nos grupos C, K, F, E, I, M e B, respectivamente, benzodiazepínico, ondansetron, 8-OH-DPAT, (5)-way 100135, acupuntura/flumazenil, flumazenil/acupuntura e acupuntura, e, as menores médias foram associadas aos grupos A, L, H, G, J e D, respectivamente, controle/salina, naloxona/acupuntura, naloxona, flumazenil, 2-Me-5-HT e acupuntura/naloxona. Já com relação aos escores que situam-se acima da média do coeficiente de variação para todos os grupos de tratamento, estão vinculados aos grupos J, A, D, L, G e H, respectivamente, 2-Me-5-HT, controle/salina, acupuntura/naloxona, naloxona/acupuntura, flumazenil e naloxona, enquanto que àqueles localizados abaixo dela encontram-se associados aos grupos B, K, M, C, F, E e I, respectivamente, acupuntura, ondansetron, flumazenil/acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, (5)-way 100135 e acupuntura/flumazenil, demonstrando com nitidez que esses grupos são àqueles que menos sofreram com a variação entre suas unidades amostrais. Com esses achados comprova-se, dessa feita, com significância estatística, o comportamento ansiolítico dos grupos de tratamento B, K, M, C, F, E e I, respectivamente, acupuntura, ondansetron, flumazenil/acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, (5)-way 100135 e acupuntura/flumazenil, diante do parâmetro %no.

Na tabela 22., também com um limite de confiança de acerto de 99%, evidencia-se comportamento idêntico, associado ao parâmetro %t, reafirmando outra vez o cunho ansiolítico do mesmos grupos de tratamento, B, K, M, C, F, E e I, respectivamente,

acupuntura, ondansetron, flumazenil/acupuntura, benzodiazepínico, 8-OH-DPAT, (5)-way 100135 e acupuntura/flumazenil.

Na Tabela 23., onde distribuem-se os postos médios de cada grupo de tratamento confrontados a cada uma das variáveis dependentes e tradicionais do LEC, %no e %t, no primeiro caso, os grupos de tratamento que atingiram os valores mais altos são, **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que os mais baixos situam-se nos grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura e, no segundo caso, novamente, os grupos de tratamento que atingiram os valores mais altos são, **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, enquanto que os mais baixos situam-se nos grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura. Têm-se, destarte, a sustentação da condição ansiolítica dos grupos de tratamento **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura.

As tabelas de número 24 à 49, demonstram todas as comparações pareadas possíveis de ocorrer entre os 13 grupos de tratamento utilizados nessa pesquisa, inclusive apresentando o intervalo dos limites de confiança de 95% de acerto. Verifica-se claramente, nas tabelas de 24 a 36 para %no e de 37 a 49 para %t, que as comparações significantes do ponto de vista estatístico, confluem mais

uma vez para a formação dos grupos **A, D, G, H, J e L**, respectivamente controle/salina, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura e **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura.

Na sumarização dessas múltiplas comparações, mostradas nas tabelas 50 e 51, respectivamente para os parâmetros %no e %t, percebe-se com transparência, que os grupos de tratamento **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, quando confrontados com o grupo controle/salina (A), guardam diferenças estatísticas significativas, portanto, são grupos inequivocamente ansiolíticos. Por outro lado, os grupos de tratamento **D, G, H, J e L**, respectivamente, acupuntura/naloxona, flumazenil, naloxona, 2-Me-5-HT e naloxona/acupuntura e **B, C, E, F, I, K e M**, respectivamente, acupuntura, benzodiazepínico, (5)-way 100135, 8-OH-DPAT, acupuntura/flumazenil, ondansetron e flumazenil/acupuntura, quando comparados com o grupo controle/salina (A), mostram diferenças significativas não comprovadas estatisticamente, o que equivale dizer, que são evidentemente ansiogênicos, o que é plenamente corroborado pelos resultados encontrados nas tabelas 52, 53 e 54.

Afora, os grupos de tratamento acupuntura (B), acupuntura/naloxona (D), acupuntura/flumazenil (I), naloxona/acupuntura (L) e flumazenil/acupuntura (M), que ressentem de qualquer referência na literatura, os resultados encontrados nesse trabalho, referentes ao uso das drogas diazepam (grupo C), (5)-Way

100135 (grupo E), 8-OH-DPAT (grupo F), flumazenil (grupo G), naloxona (grupo H), 2-Me-5-HT (grupo J) e ondansetron (grupo K) incluem o suporte relacionado a existência de trabalhos encontrados na literatura.

Assim, o comportamento do grupo benzodiazepínico (C), representado aqui pelo diazepam, no modelo animal associado à ansiedade, Labirinto Elevado em forma de Cruz (LEC), utilizando-se camundongos, está inteiramente de acordo com os achados da maioria dos autores e.g., Cole et al., 1994; Cruz et al., 1994; Rodgers et al., 1994a; Rodgers et al., 1994c; Cole et al., 1995a; Cole et al., 1995b; Rodgers et al., 1995a; Rodgers et al., 1995b; Rodgers et al., 1995c; Rodgers et al., 1995d; File et al., 1996; Hogg, 1996; Rodgers et al., 1996; Avgustinovich et al., 1997; Griebel et al., 1997; Rodgers et al., 1997a; Rodgers et al., 1997b; Rodgers et al., 1997c.

Em relação aos achados encontrados neste trabalho, com o antagonista de receptor 5-HT_{1A} (5)-Way 100135 [(S)-N-tert-butil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazina-1-il)-2-fenilpropanamida diidroclorido), (grupo E), estes estão em plena concordância com, Rodgers et al., 1994c, que exploraram a possibilidade de que o bloqueio do receptor 5-HT_{1A}, produziria um perfil de anti-ansiedade no modelo LEC com murinos, confirmando um clássico perfil ansiolítico, resultados esses, corroborados por, Rodgers et al., 1994c; Rodgers et al., 1997b; Cao et al., 1997b,c e d.

Relativamente à droga 8-OH-DPAT [8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina], um agonista do receptor 5-HT_{1A} segundo Rodgers et al., 1994a; Griebel, 1995, ele tem rendido perfis inconsistentes e freqüentemente contraditórios, na vasta maioria dos modelos animais de ansiedade e, o LEC não é nenhuma exceção a esta “regra”. Ainda que, alguma atividade francamente

ansiolítica, verificada nesse trabalho, também tenha sido observada com o (\pm)-8-OH-DPAT, o efeito predominante deste composto, também foi o de reduzir a produção comportamental (Rodgers et al., 1992a). Um trabalho muito recente, mostrou que os efeitos motores deste protótipo ligante de receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT), residem em seu R(+)-enantiômero (agonista total), considerando que qualquer ação francamente ansiolítica parece ser devido à ação do S(-)-enantiômero (agonista parcial) (Cao et al., 1997a).

Já com o flumazenil, um antagonista benzodiazepínico/GABA_A, os achados encontrados neste trabalho confirmam os resultados da maioria dos autores, e.g., PoKK et al., 1997; Broaden et al., 1988; File et al., 1989; Urbancic et al., 1990; Ferre et al., 1994.

A naloxona, um antagonista opióide, também têm seus dados observados nessa pesquisa, comprovados por outros autores, na literatura, e.g., Belzung et al., 1997 a,b, 1998; Cancela et al., 1994; Rodgers et al., 1984.

Quanto a droga 2-Me-5-HT, um agonista de receptor 5-HT₃, o único trabalho encontrado na literatura, confirma os achados deste (Artaiz et al., 1995).

O fármaco ondansetron, um potente e seletivo antagonista 5-HT₃ comportou-se como uma droga francamente ansiolítica, o que é corroborado pela maioria dos autores, Costall et al., 1991; Rodgers, 1991b; Barnes et al., 1992^a; Zifa et al., 1992; Barret et al., 1993; Handley et al., 1993; Cutler et al., 1997^a; Rodgers et al., 1997b.

Na Tabela 55., são exibidos os valores médios percentuais alcançados pelo grupo de tratamento acupuntura (B), quando confrontado com o grupo

benzodiazepínico (C), no intuito de estabelecer uma **medida de eficiência** entre esses grupos. Desde que o grupo de tratamento benzodiazepínico (C) é considerado como droga-padrão do modelo animal que mensura a ansiedade Labirinto Elevado em forma de Cruz, a comparação desse grupo, como sendo um controle-positivo é pertinente e imprecindível. Assim, pode-se verificar que a diferença entre os valores médios dos grupos B e C, respectivamente, acupuntura e benzodiazepínico, foi de 12.87% para a variável dependente %no e, e 18.04% para a variável %t. Assim, desde que foi possível a elaboração de uma **medida de eficiência significativa**, tanto para %no, como para %t, entre dois grupos (C e B), respectivamente, benzodiazepínico e acupuntura, e, considerando o primeiro como padrão, pode-se afirmar, que o grupo de tratamento acupuntura têm uma eficácia de 87.13%, diante do primeiro parâmetro e de 81.60%, frente ao segundo parâmetro, comparativamente ao grupo benzodiazepínico (tabela 56).

Nesta pesquisa, pode-se ainda, verificar que os efeitos da acupuntura (grupo B) foram revertidos pela naloxona (grupo D), o mesmo não acontecendo com o flumazenil, seja como pré e pós tratamento (grupo I e M). Tanto a naloxona, como o flumazenil, *per se*, não induziram nenhum efeito ansiolítico. Esses achados implicam o sistema opióide no efeito da acupuntura, porém, Agmo et al. (1998) Agmo et al. (1998) declaram que estudos prévios tem demonstrado que a naloxona bloqueia os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos em diversos modelos de ansiedade, incluindo o "LEC". Esses autores asseveram que, embora a naloxona tende a ligar-se preferencialmente ao receptor opióide *mu*, esta seletividade é muito baixa e, assim, o subtipo de receptor opióide importante na

modulação das ações ansiolíticas dos benzodiazepínicos no “LEC”, permanece ainda desconhecido.

Inequivocamente, a acupuntura, no mínimo, por não causar nenhum efeito indesejável e por se utilizar de substâncias químicas endógenas é preferível ao invés do uso de qualquer droga benzodiazepínica, porém a seguir fundamenta-se essa questão.

É importante notar que algumas estruturas cerebrais, como o hipocampo (Olton et al., 1979; Huttunen et al., 1986; Kostowski et al., 1989) ou a amígdala (Nagy et al., 1973; Izquierdo et al., 1991; LeDoux, 1992) estão implicadas, tanto com a memória como com a ansiedade, sendo conhecido que compostos que reduzem a ansiedade também prejudicam a memória (Beuzen et al., 1995).

Por exemplo, os benzodiazepínicos têm, não somente propriedades ansiolíticas, mas também amnésicas, no homem (Lister, 1985) e nos animais (Thiebot, 1985).

Neste contexto, já existe uma preocupação médica e pública sobre os efeitos colaterais dos ansiolíticos comumente prescritos, como os benzodiazepínicos, os quais agudamente podem incluir deterioração cognitiva e, cronicamente, o desenvolvimento de dependência (Rodgers et al., 1997a), mesmo da dose normal (Lader, 1991). Além destes problemas, que podem ou não ser manejáveis (Ashton, 1994), está amplamente estabelecido que os benzodiazepínicos, são só verdadeiramente efetivos no tratamento, de uma das muitas condições relacionadas à ansiedade, reconhecidas pelo DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994), i.e., distúrbio de ansiedade generalizado (Rodgers et al., 1997a). Desta forma, há também uma necessidade de se demonstrar,

através do desenvolvimento de modelos animais, para os *diferentes* estados de ansiedade (Lister, 1985; Beuzen et al., 1995) e, não somente para aqueles que respondem aos benzodiazepínicos (Rodgers et al., 1997a).

Especulações acerca dos mecanismos de ação da acupuntura existem em todo o mundo e, enquanto se aguarda maiores evidências relacionadas ao(s) sistema(s) de mediadores envolvidos, tem-se conhecimento de que a quantidade de tipos de receptores distintos para muitos dos agentes transmissores conhecidos aumentou. Para todos os principais transmissores, parece haver três ou quatro (ou mais) subtipos de receptores separados, freqüentemente com padrões muito distintos de distribuição dentro do cérebro (Rang et al., 1997).

Está claro, atualmente, que os mediadores químicos dentro do cérebro podem produzir efeitos lentos e de longa duração (durante minutos ou horas); que eles podem agir muito difusamente, em uma distância considerável do seu local de ação; e que podem produzir efeitos diversos, como, por exemplo, na síntese do transmissor e na expressão dos receptores dos neurotransmissores, além de afetarem a condutância iônica das células pós-sinápticas (Rang et al., 1997).

A distribuição do RNAm no SNC, determinada pela hibridização *in situ* é muito diferente para cada subunidade. É digno de nota, que a recentemente clonada α -subunidade (α_6), a qual confere, do ponto de vista farmacológico, uma única recombinação na expressão do receptor GABA_A, é somente expressada num único tipo de neurônio, no cerebelo. Portanto, torna-se claro agora, que a heterogeneidade das isoformas das subunidades do receptor GABA_A, parecem conferir uma diversidade de respostas farmacológicas, e talvez fisiológicas,

características. Por exemplo, é bem conhecido que a co-expressão de uma γ -subunidade adicional é necessária para que ocorra a potencialização da resposta do GABA pelos BDZ (Cooper et al., 1996). Portanto, as diferenças sutis na organização das subunidades, podem resultar em subpopulações de receptores GABA_A, que possuem localizações regionais e celulares distintas, cada qual com uma sensibilidade divergente ao GABA. Esta extraordinária heterogeneidade dos receptores GABA_A, claramente fornecem até agora, uma inexplorada diversidade na função dos subtipos desses receptores, afetando a sensibilidade ao GABA, a modulação pelos efetores alostéricos, a adaptação das condições à estímulos, a distribuição no interior dos neurônios e entre eles, o desenvolvimento ontogênico e as alterações nos estados patológicos (Cooper et al., 1996).

Um bom entendimento das características moleculares e da regulação dos múltiplos sítios alostéricos deste complexo supramolecular e das substâncias endógenas que podem servir-se destes sítios, podem não só contribuir para nossa compreensão das possíveis etiologias das desordens relacionadas à ansiedade, mas também auxiliar no desenvolvimento de agentes terapêuticos mais efetivos e de maior especificidade (Cooper et al., 1996).

Um amplo número do reconhecimento de sítios associados com os receptores GABA_A tem conduzido à especulação de que existem fatores regulatórios endógenos. Diversos candidatos tem sido identificados, porém com a exceção dos neuroesteróides e do inibidor de ligação do diazepam [(DBI) um peptídeo endógeno], existem pequenas e controversas evidências de que realizem

um papel importante na modulação funcional do receptor GABA_A *in vivo* (Cooper et al., 1996).

Várias evidências sugerem que o DBI funciona como um precursor da família de peptídios modulatórios alostéricos do receptor GABA_A, causando uma modulação negativa no fluxo do Cl⁻. Consistente com esta ação, o DBI parece ter propriedades ansiogênicas similares às aquelas associadas com os agonistas inversos BDZ, em experimentação animal. Um peptídio endógeno semelhante, tem sido encontrado no cérebro e fluido cerebrospinal humanos, e já foi notado que a quantidade de DBI imunorreativo é elevada no fluido cerebrospinal de pacientes severamente deprimidos (Cooper et al., 1996).

Outros postulados ligantes endógenos do receptor GABA_A, incluem dois metabólitos esteróides, oriundos da deoxicorticosterona e da progesterona (respectivamente, alotetrahydro-DOC e alopregnanolona) que ocorrem naturalmente. Estes neuroesteróides são formados no cérebro e ligam-se com alta afinidade aos receptores GABA_A, gerando efeitos semelhantes aos dos barbitúricos, que potencializam a condutância do Cl⁻. Eles estão dentre os mais potentes ligantes endógenos conhecidos do receptor GABA_A, encontrados no SNC. Seus níveis plasmáticos e cerebrais (córtex e hipotálamo) são dramaticamente aumentados em ratos expostos ao estresse. A observação de que os níveis séricos e cerebrais da alopregnanolona e alotetrahydro-DOC aumentam rapidamente após o estresse (4-20 vezes em menos de 5 minutos) sugere que estes neuroesteróides podem desempenhar um papel fisiológico no estresse e na ansiedade. Além disso, condições que podem conduzir à uma ampla elevação nos níveis destes esteróides neuroativos, como a puberdade, gravidez

ou o ciclo menstrual, podem também alterar as adaptações neuroquímicas e comportamentais durante o estresse (Cooper et al., 1996).

O complexo receptor GABA_A sofre rápidas e persistentes mudanças no cérebro de animais estressados (Biggio et al., 1990; Drugan et al., 1993; Drugan et al., 1994) conseqüentemente, os efeitos comportamentais oriundos das drogas que atuam neste complexo receptor, são diferentes em animais estressados quando comparadas aos animais não estressados (Boix et al., 1989).

É possível que o estresse induzido na pequena plataforma, possa aumentar a concentração do ligante benzodiazepínico endógeno (Pokk et al., 1997). A existência de tal ligante foi recentemente proposta (Drugan et al., 1993; Drugan et al., 1994).

Assim, o receptor GABA_A é responsivo a uma gama extraordinariamente ampla de moduladores químicos (Sieghart, 1992), incluindo vários depressores do SNC, tais como barbitúricos, etanol e esteróides anestésicos, e essas interações podem ser responsáveis pelos efeitos de muitos desses medicamentos sobre a função cerebral.

A existência de receptores benzodiazepínicos específicos sugeriu que poderia haver um ligante endógeno (análogo às endorfinas em relação ao receptor da morfina) cuja função consistisse em regular o efeito inibitório do GABA. Ainda não foi identificada de maneira definitiva uma substância desse tipo, porém já houve muita especulação (Barbaccia et al., 1988). Está bem conhecido o fato de que o GABA co-existe com transmissores clássicos como a 5-HT, DA, Ach, glicina e histamina, bem como com um grande número de peptídios incluindo CCK, NPY, VIP, substância P e muitos outros. Atualmente a função de tais moléculas que co-

existem com o GABA, especialmente os peptídios, é muitas vezes difícil de avaliar no SNC (Cooper et al., 1996). Inclusive, manipulações das funções do receptor GABA_A tem produzido alta variabilidade e, muitas vezes, resultados negativos em modelos animais de ansiedade (Sanger, 1985; Shephard, 1986 e 1987), um perfil que não é inconsistente com a possibilidade de que os benzodiazepínicos atenuam a ansiedade, através de outros mecanismos diferentes do que a via receptor GABA_A (Paredes et al., 1992).

Por falar em peptídios, quase todos os peptídios afetam células-alvo específicas no sistema nervoso central e periférico, incluindo os neurônios, as células da glia e músculo liso glandular e vascular. Até hoje, o censo relativo aos peptídios com desconhecida função já excede uma centena. Porém, sabe-se que as concentrações molares de qualquer peptídio encontrado no cérebro, possui uma magnitude máxima duas à três vezes mais reduzida do que as monoaminas, a acetilcolina (Ach) e os aminoácidos e, que os seus receptores respondem efetivamente à estas baixas concentrações. As vantagens exclusivas associadas aos peptídios ainda não são óbvias. Além disso, com poucas exceções, estas substâncias não foram ainda vinculadas de maneira seletiva à um determinado sistema funcional no cérebro ou correlacionadas de qualquer forma específica com algum estado patológico (Cooper et al., 1996).

Nos casos em que a forma pró-peptídio pode dar lugar à diferentes agonistas, é possível – embora não amplamente comprovado – que mais do que um peptídio mensageiro é liberado conjuntamente. A noção da coexistência de outros transmissores com os peptídios, conduziu a uma reflexão acerca de haver neurônios verdadeiramente “peptidérgicos” ou somente àqueles, nos quais um

peptídio ou dois ampliam o municiamento de moléculas mensageiras disponíveis (Cooper et al., 1996).

De qualquer forma, o neurônio pode ser capaz de transmitir uma mensagem “enriquecida”, empregando mais do que um único tipo de transmissor e, este conceito revolucionário impulsionou outra questão: se o peptídio não é a molécula sinalizadora exclusiva, mas a menor, uma fração percentual da capacidade de sinalização do terminal nervoso, então como eles afetam os sinais transmitidos na coexistência com aminoácidos ou monoaminas? Infelizmente, exceto pelo circuito opióide no hipocampo, recentemente desvendado, esse mecanismo permanece desconhecido. Não obstante este fato, no sistema nervoso autônomo, segundo Tomas Hökfelt e colaboradores (1994), encontra-se pelo menos um peptídio em cada neurônio estudado dos sistemas simpático, parassimpático e entérico, alguns com sólidas interações com monoaminas.

Além disso, sabe-se que o peptídio intestinal vasoativo (VIP), liberado diante de alta freqüência nos terminais colinérgicos, aumenta o controle parassimpático da salivação, através da elevação do fluxo sangüíneo glandular. O neuropeptídio Y (NPY), encontrado em muitos neurônios simpáticos, sensibiliza o músculo liso, conhecido alvo adrenérgico (Cooper et al., 1996).

Portanto, efeitos dos agonistas ou antagonistas peptídicos, podem alterar o fluxo de informação neuronal, através da perturbação das relações simbióticas normais existentes entre essas células. Outras ações dos peptídios, embora não necessariamente na coexistência com transmissores associados aos aminoácidos ou monoaminas, tem sido relatados com irregularidade: aumento ou redução da quantidade de transmissor liberado na aplicação de um estímulo e elevação ou

diminuição da resposta da célula-alvo (na sua amplitude ou duração, ou em ambos). Por exemplo, o VIP acentua vigorosamente a resposta do AMPc nos neurônios corticais à baixas doses de noradrenalina e galanina, modificando a liberação de acetilcolina no hipocampo ventral. Não seria presunção considerar que o peptídeo freqüentemente “embeleza” o que o transmissor primário procura realizar numa conexão neuronal. Tal efeito, pode ser fortalecer ou prolongar as ações do transmissor primário, especialmente nas situações onde a freqüência é mais alta do que normalmente (Cooper et al., 1996).

O peptídeo pode prover uma parte do sinal intraneuronal, visando alterar a taxa de produção do transmissor primário, e ainda pode haver locais, nos quais o próprio peptídeo pode cumprir todos os efeitos do transmissor primário (Cooper et al., 1996). Além disso, o exame de genes de alguns neuropeptídeos tem revelado elementos genéticos reguladores que realizam a transcrição e influenciam a sensibilidade aos hormônios gonadais (oxitocina, vasopressina e pró-encefalina) ou os segundos mensageiros intracelulares (liberação de VIP, pró-encefalina, neurotensina, corticotrofina e pró-somatostatina), promovendo uma evidência direta da independência dos co-transmissores. Em diversos sistemas peptídicos, evidências farmacológicas sugerem que os catabólitos dos peptídeos secretados podem ter real valor de sinalização, tanto sobre o neurônio que o liberou, como sobre o neurônio pós-sináptico (Cooper et al., 1996).

O peptídeo pró-dinorfina consiste de um C-terminal agregado nas formas de leu⁵-encefalina, que surge de genes e RNAm diferentes, que codificam a produção de quatro peptídeos principais, denominados dinorfina A, dinorfina B, e duas neoendorfinas, α e β (Cooper et al., 1996).

Este C-terminal agregado ao peptídeo, faz com que este tenha uma atuação de um potente agonista opióide sem sofrer a clivagem que ocorre na forma encefalina, sendo que após o seu mapeamento, representam uma terceira série separada de distribuição nos neurônios centrais e periféricos. Cada uma dessas classes de neurônios (associados à POMC, encefalinas e dinorfinas) contém β -endorfina, encefalina ou dinorfina com distintas características morfológicas. Os neurônios relacionados com a β -endorfina formam sistemas de projeções longas que alcançam o sistema endócrino, localizado no hipotálamo medial, diencéfalo e ponte. Os peptídios derivados da pró-encefalina e pró-dinorfina, são geralmente encontrados em neurônios com pequenas e modestas projeções, em grupos que são muito dispersos. Em algumas regiões estes peptídios mostram intrigantes relações. Por exemplo, os neurônios vinculados às encefalinas, projetam-se do córtex entorrinal para a camada molecular do girus dentato (giro denteado) no hipocampo, enquanto que àqueles associados às dinorfinas projetam-se do girus dentato para as células piramidais na área CA₃. Assim, os opióides aumentam a atividade em algumas vias neuronais, presumivelmente por suprimirem a deflagração dos interneurônios inibitórios (Cooper et al., 1996; Rang et al., 1997).

A estimulação de alta frequência na ativação das células granulares do girus dentato, que contém dinorfina, conduz a uma supressão naloxona-sensível de IPSPs (potencial pós-sináptico tardio), arquivados nas células piramidais na área CA₃, no entanto, essa alegação inicial de ação sináptica foi logo atribuída a supressão opióide pré-sináptica na liberação de noradrenalina.

Um segundo efeito sináptico foi então detectado como sendo uma resposta excitatória embotada, durante a estimulação das células granulares do giro denteado por elas próprias (as únicas que contêm dinorfina); contudo, esse efeito tem-se mostrado ser um mecanismo totalmente novo, no qual a dinorfina dendrítica atua como um transmissor retrógrado, visando reduzir a liberação pré-sináptica do glutamato (Cooper et al., 1996).

Agmo et al. (1998) Agmo et al. (1998) declaram que estudos prévios tem demonstrado que a naloxona bloqueia os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos em diversos modelos de ansiedade, incluindo o “LEC”. Esses autores asseveram que, embora a naloxona tende a ligar-se preferencialmente ao receptor opióide *mu*, esta seletividade é muito baixa e, assim, o subtipo de receptor opióide importante na modulação das ações ansiolíticas dos benzodiazepínicos no “LEC”, permanece ainda desconhecido.

Além disso, outro trabalho de pesquisa mostra que os subtipos de receptores opióides *mu* e *kappa* são importantes para as ações ansiolíticas do clordiazepóxido no elevado “LEC”, propondo uma interação entre os sistemas GABAérgico e opióide. Desde 1985, Rodgers e colaboradores sugerem que, pelo menos alguns efeitos comportamentais dos benzodiazepínicos podem envolver uma interação com mecanismos opióides endógenos. Vários relatos associados ao fato de que a naloxona bloqueia os efeitos anti-conflito do diazepam e do clordiazepóxido, e atenua a perda de inibição comportamental produzida pelos BDZ em tarefas envolvendo punição e não-recompensa, sugerem o envolvimento de opióides endógenos na ação ansiolítica dos benzodiazepínicos (Tripp et al., 1991 e 1992). Os resultados desses experimentos sugerem que o sistema opióide

endógeno está envolvido na ação ansiolítica dos benzodiazepínicos quando os animais estão se adaptando ao conflito recentemente introduzido. Logo que a adaptação ocorra, outro sistema de neurotransmissores medeia as ações dos benzodiazepínicos. Corroborando com essa inter-relação (sistemas GABAérgico e opióide), Rosland et al. (1990), estudando o mecanismo associado ao antagonismo dos benzodiazepínicos diante da antinocicepção produzida pelos opióides, nos camundongos submetidos aos testes de beliscão de cauda e placa quente, verificaram que tanto em dose única como em doses repetidas, o diazepam antagonizava os efeitos antinociceptivos da morfina.

Observaram ainda, que o flumazenil, um antagonista benzodiazepínico específico, revertia completamente esse efeito antagônico entre a morfina e o diazepam. Estes autores efetuaram uma espinalização na altura do nível médio da coluna torácica, que também resultou na abolição desse antagonismo, indicando que este efeito ocorre nas áreas mais altas do SNC.

Enquanto isso, estabelecida a verossímil ação ansiolítica exibida pelo grupo de tratamento acupuntura e, ainda estudando-se minuciosamente outra ocorrência que merece ser considerada especificamente, refere-se ao fato de que a naloxona, um antagonista de receptores opióides [com alta afinidade pelos receptores μ , δ e κ (Rang et al., 1997)], ter revertido totalmente a sugestiva ação ansiolítica do grupo de tratamento acupuntura, proporcionando, dessa forma, vigorosas indicações da participação do sistema opióide, nesse efeito, no mínimo, como o principal sistema envolvido nele.

Esses resultados bastariam *per se*, para que se possa sugerir firmemente que a acupuntura possui uma inegável ação ansiolítica. Contudo, quando se agrega a esse excelente resultado, àqueles outros observados no início dessa discussão, pode-se presumir com vigor que a acupuntura representa uma terapêutica ansiolítica de evidente valor. Pode-se afirmar categoricamente, que o efeito ansiolítico produzido pela acupuntura é diretamente e totalmente dependente da sua própria ação ou do seu desempenho, quando se rejeitou a hipótese de independência e, sobretudo pode-se asseverar peremptoriamente, que esse seu efeito independe de outras variáveis, como deixa claro a análise de variância. Em quinto lugar nessa escala seqüencial de significância estatística, observa-se no confronto entre o grupo de tratamento controle/salina (A) e o grupo de tratamento acupuntura/naloxona (D),. Neste caso, como na comparação entre o grupo de tratamento diazepam (C) e o grupo de tratamento acupuntura/naloxona (D) e, também entre o grupo de tratamento controle/salina (A) e o grupo de tratamento acupuntura/naloxona (D), os resultados alcançados apenas importam, do ponto de vista experimental, para tornar estabelecida e clara a diferença estatisticamente significativa entre eles.

Não obstante, ter-se a imperiosa necessidade de dar continuidade às pesquisas relacionadas com a acupuntura, principalmente sob o ponto de vista neurofarmacológico, uma importante questão ainda não respondida perdura: será o peptídeo opióide liberado na acupuntura o benzodiazepínico endógeno ?

8. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos neste trabalho permitiu as seguintes conclusões:

1. A acupuntura, quando utilizados a combinação dos pontos C7 e Yin Tang, possui efeitos ansiolíticos.
2. Os efeitos ansiolíticos observados no tratamento com acupuntura, na combinação dos pontos C7 e Yin Tang, denotam eficácia semelhante à do diazepam.
3. Nos mecanismos associados às ações ansiolíticas verificadas com a acupuntura o principal sistema de mediadores implicado é o opióide.

4. A localização anatomotopográfica do acuponto C7 em camundongos *Mus musculus*, variedade albino suíço é especificamente no lado radial do tendão do músculo flexor cubital do carpo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamec, R. E.; Sayin, U.; Brown, A. The effects of corticotrophin releasing factor (CRF) and handling stress on behavior in the elevated plus-maze test of anxiety. *J. Psychopharmacol.* 5:175-186; 1991.
2. Adamec, R. E.; Shallow, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol. Behav.* 54:101-109; 1993.
3. Ágmo, A.; Pruneda, R.; Guzman, M.; Gutierrez, M. GABAergic drugs and conflict behavior in the rat: lack of similarities with the actions of benzodiazepines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 314-322, 1991.
4. Albonetti, M. E.; Farabollini, F. Behavioural responses to a single and repeated restraint in male and female rats. *Behav. Proc.* 28:97-110; 1992.
5. Altman, D.G.; Chapman A.H.; Hall, A.S. *Practical Statistics for Medical Research.* Great Britain, London. 1991. 611pg.
6. American Psychiatric Association. *DSM-IV. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed.* Washington, DC: APA; 1994.
7. Andrews, N. A.; Zarkovsky, A.; File, S. E. Handling stress: Benzodiazepine binding and behaviour in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 120:305P; 1991.
8. Andrews, N.; File, S. E. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *Eur J Pharmacol* 235: 109-112, 1993.

9. Andrews, N.; Hogg, S.; Gonzalez, L. E.; File, S. E. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours, respectively. *European Journal of Pharmacology*. 264: 259-264, 1994.
10. Armario, A.; Gil, M.; Marti, J.; Pol, O.; Balasch, J. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a hole-board and in the forced swim test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 39: 373-377, 1991.
11. Ashton, H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. *Drugs*. 48:25-40; 1994.
12. Auroche, B., Navailh, P. O diagnóstico na medicina chinesa. São Paulo : [s.n.], 1986. 420 p.
13. Avgustinovich, D. F.; Gorbach, O. V.; Kudryavtseva, N. N. Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiol. Behav.* 1:37-43; 1997.
14. Baber, J. e Mayer, D. J. - Evaluation of the efficacy and neural mechanism of a hypnotic analgesia procedure in experimental and clinical dental pain. *Pain*, 4: 41-48, 1977.
15. Baldwin, H. A.; File, S. E. The elevated plus-maze test of anxiety; Further behavioural validation. *Psychopharmacology (Berlin)* 89:S9; 1986.
16. Ballenger, J. C. The neurobiology of panic. Wiley-Liss, New York, 1990.
17. Barbaccia, M. L.; Costa, E.; Guidotti, A. Endogenous ligands for high-affinity recognition sites of psychotropic drugs. *Annu RverPharmacol* 28: 451-476, 1988.
18. Barlow, D. H. Disorders of emotion. *Psychol. Inquiry*. 2:58-105; 1991.

19. Barnes, N. M.; Costall, B.; Domeney, A. M.; Gerrard, P. A.; Kelly, M. E.; Kröhling, H.; Naylor, R. J.; Tomkins, D. M.; Williams, T. J. The effects of umespirone as a potential anxiolytic and antipsychotic agent. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40:89-96; 1991.
20. Barret, J. E. Animal behaviour models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs acting at serotonin receptors. In: Olivier, B.; Mos, J.; Stangen, J. L., eds. *Animal models in psychopharmacology*. Basel: Birkhäuser; 1991:37-57.
21. Barrett, J. E.; Vanover, K. E. 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanisms and future directions. *Psychopharmacology*. 112: 1-12, 1992.
22. Barros, H. M. T.; Tannhauser, S. L.; Tannhauser, M. A. L.; Tannhauser, M. Effect of sodium valproate on the open-field behavior of rats. *Brazil J Med Biol Res.* 25: 281-287, 1992.
23. Bastos, S. R. C. *Tratado de eletroacupuntura : perspectivas científicas, teoria e prática*. Rio de Janeiro : Numem, 1993. 499 p.
24. Beck, A. T. *Cognitive therapy of the emotional disorders*. New York: New American Library; 1976.
25. Beck, A. T.; Emery, G. *Anxiety disorders and phobias: a cognitive perspective*. New York: Basic Books; 1985.
26. Becker, A.; Grecksch, G.; Matthies, H. The influence of diazepam on learning processes impaired by pentylenetetrazol kindung. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 349:492-496; 1994.

27. Beecher, H. K. - Placebo analgesia in human volunteers. *J Am Med Assoc*, 159: 1602-1606, 1955.
28. Belzung, C.; Naloxone potentiates the anxiolytic but not the amnesic action of chlordiazepoxide in C57NL/6 mice. *Behav Pharmacol* 9(8):691-8, 1998.
29. Belzung, C.; Agmo, A. Naloxone potentiates the effects of subeffective doses of anxiolytic agents in mice. *Eur J Pharmacol* 323:2-3, 133-136, 1997.
30. Belzung, C.; Le Pape, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 56:623-628; 1994.
31. Beuzen, A.; Belzung, C. Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis. *Physiol. Behav.* 1:111-118; 1995.
32. Biggio, G.; Concas, A.; Corda, M. G.; Giorgi, O.; Sanna, E.; Serra, M. GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: Effects of estress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol. Ther.* 48:121-142; 1990.
33. Bill, D. J.; Knight, M.; Forster, E. A.; Fletcher, A. Direct evidence for an important species difference in the mechanism of 8-OH-DPAT-induced hypothermia. *British Journal of Pharmacology.* 103: 1857-1864, 1991.
34. Blackburn, T. P. 5-HT receptors and anxiolytic drugs. In: Marsden, C. A.; Heal, D. J. (eds). *Central serotonin receptors and psychotropic drugs.* Blackwell Scientific Publication, Oxford, p. 175-197. 1992.
35. Blanchard, D. C.; Blanchard, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. In: Rosenzweig, M. R.; Porter, L. W., eds. *Annual review of psychology.* Palo Alto: Annual Reviews Inc.; 1988:43-68.

36. Blanchard, D. C.; Blanchard, R. J.; Rodgers, R. J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B.; Mos, J.; Stangen, J. L., eds. *Animal models in psychopharmacology*. Basel: Birkhäuser; 1991:117-134. (b)
37. Blanchard, D. C.; Blanchard, R. J.; Rodgers, R. J.; Weiss, S. M. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggressive Behavior*. 16:165-176; 1990. (b)
38. Blanchard, R. J.; Blanchard, D. C. Affect and aggression: an animal model applied to human behavior. In: Blanchard, R. J.; Blanchard, D. C., eds. *Advances in the study of aggression*. Orlando: Academic Press; 1984:1-62.
39. Blanchard, R. J.; Blanchard, D. C. Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.* 103:70-82; 1989. (a)
40. Blanchard, R. J.; Blanchard, D. C.; Agullana, R.; Weiss, S. M. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol. Behav.* 50:967-972; 1991. (a)
41. Blanchard, R. J.; Blanchard, D. C.; Rodgers, R. J.; Weiss, S. M. The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14:491-496; 1990. (a)
42. Blanchard, R. J.; Brain, P. F.; Parmigiani, S.; Blanchard, D. C. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Dordrecht: Kluwer; 1989. (b)
43. Blanchard, R. J.; Parmigiani, S.; Bjornson, C.; Masuda, C.; Weiss, S. M.; Blanchard, D. C. Antipredator behavior of Swiss-Webster mice in a visible burrow system. *Aggressive Behav.* 21:123-136; 1995.

44. Blanchard, R. J.; Yudko, E. B.; Rodgers, R. J.; Blanchard, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain Res.* 58:155-165; 1993.
45. Blau, J. N. (ed). *Migraine*. Chapman & Hall, London, 1987.
46. Bobker, D. H.; Williams, J. T. Ion conductances affected by 5-HT receptor subtypes in mammalian neurons. *Trends Neurosci* 13: 169-173, 1990.
47. Bodnoff, S. R.; Suranyi-Cadotte, B.; Aitken, D. H.; Quirion, R.; Meaney, M. J. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*. 92: 298-302, 1988.
48. Boix, F.; Fernandez-Teruel, A.; Tobena, A. The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 31: 541-546, 1989.
49. Borman, J. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* 11: 112-116, 1988.
50. Bowery, N. G. Baclofen: 10 years on. *Trends Pharmacology Sci* 3: 400-403, 1982.
51. Bowery, N. G. GABA_B receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 109-147, 1993.
52. Braestrup, C.; Nielsen, M. Benzodiazepine receptor binding in vivo and efficacy. In: Olse, R. W.; Venter, J. C. (eds). *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels*. 1 Receptor biochemistry and methodology. Liss, New York, vol. 5. 1986.
53. Brett, R. R.; Pratt, J. A. Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 178:135-138; 1990.

54. Britton, K. T.; Page, M.; Baldwin, H. A.; Koob, G. F. Anxiolytic activity of steroid anaesthetic alphaxalone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258:124-129; 1991.
55. Broaden, R. N.; Goa, K. L. Flumazenil. A preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and clinical use. *Drugs.* 35: 448-467, 1988.
56. Burt, D. R.; Kamatchi, G. L. GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J* 5: 2916-2923, 1991.
57. Cancela, L. M.; Bregonzio, C.; Molina, V. A. Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversible by naloxone pretreatment. *Brain Res. Bull.* 36(3):209-213; 1994.
58. Cannizzaro, G.; Flugy, A.; Novara, V.; Provenzano, P. M. Interaction between naloxone, chlordiazepoxide and valproic acid evaluated by emotional operant behavior in the rat. *Arzneimittelforschung.* 37: 6-9, 1987.
59. Cao, B. J.; Rodgers, R. J. Anxiolytic-like profile of p-MPPI, a novel 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze. *Psychopharmacology.* (Berlin) 129: 365-371, 1997. (b)
60. Cao, B. J.; Rodgers, R. J. Comparative behavioural profiles of buspirone and its metabolite 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine (1-PP) in the murine elevated plus-maze. *Neuropharmacology.* 36: 8, 1089-1097, 1997. (e)
61. Cao, B. J.; Rodgers, R. J. Different behavioural profiles of the R(+)- and S(-)-enantiomers of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) in the murine elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology.* 1997. (a)

62. Cao, B. J.; Rodgers, R. J. Influence of 5-HT_{1A} receptor antagonism on plus-maze behaviour in mice. I. Pindolol enantiomers and pindobind 5-HT_{1A} Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 58: 583-591, 1997. (c)
63. Cao, B. J.; Rodgers, R. J. Influence of 5-HT_{1A} receptor antagonism on plus-maze behaviour in mice. II. WAY 100635, SDZ 216-525 and NAN-190. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 58: 593-603, 1997. (d)
64. Carli, M.; Prontera, C.; Samanin, R. Evidence that central 5-hydroxytryptaminergic neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. Br J Pharmacol 96: 829-836, 1989.
65. Cassella, J. V.; Davis, M. Fear-enhanced acoustic startle is not attenuated by acute or chronic imipramine treatment in rats. Psychopharmacology. 87: 278-282, 1985.
66. Charrier, D.; Dangoumau, L.; Puech, A. J.; Hamon, M.; Thiebot, M. H. Failure of CCK receptor ligands to modify anxiety-related behavioural suppression in an operant conflict paradigm in rats. Psychopharmacology. 121: 127-134, 1995.
67. Cho, Z. H.; Chung, S. C.; Jones, J. P.; Park, J. B.; Park, H. J.; Lee, H. J.; Wong, E. K. e Min, B. I. - New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 2670-2673, 1998.
68. Clark, D. M. Anxiety states: panic and generalized anxiety. In: Hawton, K.; Salkovkis, P. M.; Kirk, J.; Clark, D. M., eds. Cognitive behaviour therapy for psychiatric problems: a practical guide. Oxford: Oxford Medical Publications; 1989:52-96.

69. Cole, E. F. Avaliação dos efeitos terapêuticos obtidos com a alopatia e a acupuntura no tratamento de distúrbios neurológicos decorrentes da cinomose canina. Recife, 1996. 204 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
70. Cole, E. F. Correspondência pessoal; 1998.
71. Cole, E. F.; Samico, A. J. R.; Jimenez, G. C.; Siqueira, S. W.; Adrião, M. G. F.; Sá, F. B.; Azevedo, G. I. C. Caracterização anatômica do Zu zan li, Bai huanshu e Yin tang em camundongos "Mus musculus" variedade albino suíço. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. p. 89, 1994.
72. Cole, J. C.; Burroughs, G. J.; Laverty, C. R.; Sheriff, N. C.; Sparham, E. A.; Rodgers, R. J. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine elevated plus-maze: Strain independence and evidence against α_2 -adrenoceptor mediation. *Psychopharmacology (Berlin)* 118:425-436; 1995. (a)
73. Cole, J. C.; Rodgers, R. J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*. 4: 573-580. 1993.
74. Cole, J. C.; Rodgers, R. J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 52: 473-478. 1995 (b).
75. Cole, J. C.; Rodgers, R. J. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology*. 114: 228-296, 1994.

76. Cole, Jimenez, G. C.; E. F.; Samico, A. J. R.; Siqueira, S. W.; Adrião, M. G. F.; Sá, F. B.; Azevedo, G. I. C. Efeitos terapêuticos ligados a musculatura lisa de camundongos produzido pela acupuntura. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. p. 89 ,1994.
77. Commissaris, R. L.; Humrich, J.; Johns, J.; Geere, D. G.; Fontana, D. J. The effects of selective and non-selective monoamine oxidase (MAO) inhibitors on conflict behaviour in the rat. Behav Pharmacol 6: 195-202, 1995.
78. Conover, W.J. Practical Nonparametric Statistics. Second edition, John Wiley & Sons, New York, 1980. 495pg.
79. Conti, L. M.; Maciver, C. R. Ferkany, J. W.; Abreu, M. E. Footschock-induced freezing behavior in rats as a model of assessing anxiolytics. Psychopharmacology. 102: 492-497, 1990.
80. Cook, L.; Sepinwall, J. Benzodiazepine receptor dynamics and ligands. Psychopharmacology Bull 16: 30-32, 1980.
81. Cooper, J. R.; Bloom, F. E.; Roth, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology. 7^a ed. New York, Oxford University Press, 1996. 6/ Amino acid transmitters p. 126-193.
82. Cooper, J. R.; Bloom, F. E.; Roth, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology. 7^a ed. New York, Oxford University Press, 1996. 6/ Amino acid transmitters p. 352-391.
83. Corbett, R.; Fielding, S.; Cornfelt, M.; Dunn, R. W. GABA mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus-maze procedures. Psychopharmacology. 104: 312-316, 1991.

84. Corda, M. G.; Biggio, G. Proconflict effect of GABA receptor complex antagonists reversal by diazepam. *Neuropharmacology*. 25: 541-544, 1986.
85. Costa, E.; Ferrari, P.; Ferrero, P.; Guidotti, A. Multiple signals in GABAergic transmission: pharmacological consequences. *Neuropharmacology*. 23: 989-991, 1984.
86. Costall, B.; Domeney, A. M.; Gerrard, P. A.; Kelly, M. E.; Naylor, R. J. Zacopride: anxiolytic profile in rodent and primate models of anxiety. *J. Pharm Pharmacol* 40: 302-305, 1988.
87. Costall, B.; Domeney, A. M.; Hughes, J.; Kelley, M. E.; Naylor, R. J.; Woodruff, G. N. Anxiolytic effects of CCK-B antagonists. *Neuropeptides* 19 (Suppl):65-73; 1991.
88. Crawley, J. N.; Davis, L. G. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res. Bull.* 8:609-612; 1982.
89. Crawley, J. N.; Skolnick, P.; Paul, S. M. Absence of intrinsic antagonist actions of benzodiazepine antagonists on an exploratory model of anxiety in the mouse. *Neuropharmacology*. 23: 531-537, 1984.
90. Cruz, A. P. M.; Frei, F.; Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49:171-176; 1994.
91. Cutler, M. G. Anxiolytic drugs; does ethopharmacological analysis indicate commonalities in their mode of action?/ In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (ed). *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley, 1994. p. 45-58.

92. Cutler, M. G.; Rodgers, R. J. ; Jackson, J. E. Behavioural effects in mice of subchronic buspirone, ondansetron and tianeptine. I. Social interactions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 56: 287-293, 1997. (a)
93. Cutler, M. G.; Rodgers, R. J.; Jackson, J. E. Behavioural effects in mice of subchronic chlordiazepoxide, maprotiline and fluvoxamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 57: 127-136, 1997. (b)
94. Da Rocha, M. A. Jr.; Puech, A. J.; Thiébot, M. H. Influence of anxiolytic drugs on the effects of specific serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacology*. 11:3, 211-218, 1997.
95. Dalvi, A.; Rodgers, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology*. 128: 380-397, 1996.
96. Davis, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Psychology*. 15:353-375; 1992.
97. De Angelis, L. Comparative effects of valproate, anxiolytic, or anxiogenic drugs on the light/dark aversion test. *Drug Dev Res* 25: 331-338, 1992.
98. De Vry, J.; Benz, U.; Schreiber, R.; Traber, J. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur J Pharmacol* 249: 331-339, 1993.
99. Deakin, J. F. W.; Graeff, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacology*. 5:305-315; 1991.
100. Den Boer, J. A.; Westenberg, H. G. M.; De Leeuw, A. S.; van Vliet, I. M. Biological dissection of anxiety disorders: the clinical role of selective serotonin reuptake inhibitors with particular reference to fluvoxamine. *International Clinical Psychopharmacology*. 9:[Suppl. 4] 47-52, 1995.

101. Depaulis, A.; Bandler, R. J. The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. New York: Plenum Press; 1991.
102. DeVry, J. 5-HT_{1A} receptor agonists recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology*. 121: 1-26, 1995.
103. Dews, P. B. Pavlov and psychiatry. *J. Hist. Behav.* 17:246-250; 1981.
104. Doble, A.; Martin, I. L. Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13: 76-81, 1992.
105. Drugan, R. C.; Basile, A. S.; Ha, J-L.; Ferland, R. J. The protective effects of stress control may be mediated by increased brain levels of benzodiazepine receptor agonists. *Brain Res* 661: 127-136, 1994.
106. Drugan, R. C.; Paul, S. M.; Crawley, J. N. Decreased forebrain [³⁵S] TBPS binding and increased [³H]muscimol binding in rats that do not develop stress-induced behavioral depression. *Brain Res* 631: 270-276, 1993.
107. Edmunds, M. Defence in animals. Harlow: Longman; 1974.
108. Eison, A. S.; Temple, D. L. Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on its mechanism of action. *Am J Med* 80:[Suppl. 3B] 1-9, 1986.
109. Elliott, J. M.; Heal, D. J.; Marsden, C. A. Experimental approaches to anxiety and depression. Chichester: Wiley, 1992.
110. Eysenck, M. W. Cognitive factors in clinical anxiety: potential relevance to therapy. In: Briley, M.; File, S. E., eds. *New concepts in anxiety*. London: Macmillan Press; 1991: 418-433.

111. Falter, U.; Gower, A. J.; Gobert, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav. Pharmacol.* 3:123-128; 1992.
112. Fernandes, C.; File, S. E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:31-40; 1996.
113. Fernandez, E. Estructure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav. Brain Res.* 1:105-112; 1997.
114. Ferrari, M. D.; Saxena, P. R. Clinical and experimental effects of sumatriptan in humans. *Trends Pharmacol Sci* 14: 129-133, 1993.
115. Ferre, P.; Fernandez Teruel, A.; Escorihuela, R. M.; Garcia, E.; Zapata, A.; Tobena, A. Struggling and flumazenil effects in the swimming test are related to the level of anxiety in mice. *Neuropsychobiology.* 29: 23-27, 1994.
116. Ferretti, C.; Blengio, M.; Gamalero, S. R.; Ghi, P. Biochemical and behavioural changes induced by acute stress in a chronic variate stress model of depression: the effect of amitryptilline. *Eur J Pharmacol* 280: 19-26, 1995.
117. File, S. E. The anxiogenic action of benzodiazepine antagonists. *Neuropharmacology.* 21: 1033-1037, 1982.
118. File, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J. M.; Heal, D. J.; Marsden, C. A., eds. *Experimental approaches to anxiety and depression.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1992:25-44.
119. File, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100:281-282; 1990.

120. File, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 58:199-202; 1993.
121. File, S. E. The use of social interaction as a method of detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J. Neurosci. Methods.* 2:219-238; 1980.
122. File, S. E.; Andrews, N.; Wu, P. Y.; Zangrossi, H., Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur. J. Pharmacol.* 218:9-14; 1992.
123. File, S. E.; Aranko, K. Sodium valproate and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. *Neuropsychobiology.* 20: 82-86, 1988.
124. File, S. E.; Baldwin, H. A.; Hitchcott, P. K. Flumazenil but not nitrendipine reverses the increased anxiety during ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology.* 98: 262-264, 1989. (a)
125. File, S. E.; Gonzalez, L. E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A} receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 54: 123-128, 1996.
126. File, S. E.; Johnston, A. L. Lack of effects of 5-HT₃ receptor antagonists in the social interaction and elevated plus-maze tests of anxiety in the rat. *Psychopharmacology.* 99: 248-251, 1989. (b)
127. File, S. E.; Lister, R. G. Do the reductions in social interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions? *Neuropharmacology.* 23: 793-796, 1984.
128. File, S. E.; Mabbutt, P. S.; Hitchcott, P. K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin).* 102:98-101; 1990.

129. File, S. E.; Pellow, S. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacology*. 88: 1-11, 1986.
130. File, S. E.; Zangrossi, H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*. 110: 240-244, 1991.
131. File, S. E.; Zangrossi, H., Jr. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology (Berlin)* 110:240-244; 1993.
132. Fletcher, A.; Cliffe, I. A.; Dourish, C. T. Silent 5-HT_{1A} receptor antagonists: utility as research tools and therapeutic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*. 14: 441-448, 1993.
133. Fozard, J. R. Basic mechanism of anti-migraine drugs. *Adv Neurol* 33: 295-307, 1982.
134. Fozard, J. R. The pharmacological basis of migraine treatment. In: Blau, J. N. (ed). *Migraine*. Chapman & Hall, London, 1987.
135. Fozard, J. R. (ed). *The peripheral actions of 5-hydroxytryptamine*. Oxford University Press, Oxford, 1989.
136. Friberg, L. ; Olesen, J.; Iversen, H. K.; Sperling, B. Migraine pain associated with middle cerebral artery dilatation: reversal by sumatriptan. *Lancet*. 338: 13-17, 1991.
137. Gao, B.; Cutler, M. G. Effects of acute administration of the 5-HT₃ receptor antagonist, BRL 46470A, on the behaviour of mice in two compartment light-dark box and during social interactions in their home cage and unfamiliar neutral cage. *Neuropharmacology*. 31: 743-748, 1992. (b)

138. Gao, B.; Cutler, M. G. Effects of quinpirole on the behaviour shown by mice in the light-dark box and during social interactions. *Neuropharmacology*. 32: 93-100, 1993.
139. Gao, B.; Cutler, M. G. Effects of subchronic treatment with chlordiazepoxide, buspirone and the 5-HT₃ receptor antagonist, BRL 46470, on the social behaviour of mice. *Neuropharmacology*. 31: 207-213, 1992. (a)
140. Garbe, C. M.; Kemble, E. D. Effects of prior agonistic experience on risk assessment and approach behavior evoked a familiar and unfamiliar conspecific odors. *Aggressive Behav*. 20:143-149; 1994.
141. Gardner, C. R.; Piper, D. C. Effects of agents which enhance GABA-mediated neurotransmission on licking conflict in rats and exploration in mice. *Eur J Pharmacol* 83: 25-33, 1982.
142. Giusti, A.; Guidotti, A.; Danysz, W.; Auta, J.; Costa, E. Neuropharmacological evidence for an interaction between the GABA uptake inhibitor CI-966 and anxiolytic benzodiazepines. *Drug Dev Res* 21: 217-225, 1990.
143. Goa, K.; Ward, A. Buspirone: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an anxiolytic. *Drugs*. 32: 114-129, 1986.
144. Goldstein, A. e Hilgard, E. F. - Failure of the opiate antagonist naloxone to modify hypnotic analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 2041-2043, 1975.
145. Gomes, A. L. J., Botsaris, A.S., Antunes, R. C. et al. Bases da medicina tradicional chinesa. Rio de Janeiro : Instituto de Acupuntura do Rio de Janeiro, 1993. 380 p.
146. Goodman, L. A. The analysis of cross-classified data independence, quasi-independence, and interations in contingency tables with or without missing

- values. *Journal of the American Statistical Association*, Washington. V. 63, p. 1091-1131, 1968.
147. Goodman, L. A. The analysis of multidimensional contingency tables, step-wise procedures and direct estimation methods for building models for multiple classifications. *Technometric*, Alexandria. V. 13, p. 33-61, 1971.
148. Goodman, L. A. The multivariate analysis of qualitative data: interactions among multiple classifications. *Journal of the American Statistical Association*, Washington. V. 65, n. 329, p. 226-256, Mar. 1970.
149. Grasby, P. M.; Sharp, T.; Allen, T.; Kelly, P. A. T.; Graham-Smith, D. G. Effects of the 5-HT_{1A} partial agonists gepirone, ipsarone and buspirone on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Psychopharmacology*. 106: 97-101, 1992.
150. Gray, J. A. Multiple book review of the neuropsychology of anxiety: An inquiry into the functions of the septo hippocampal system. *Behav. Brain Sci.* 5:469-543; 1982.
151. Green, A. R. (ed). *Neuropharmacology of serotonin*. Oxford University Press, Oxford, 1985.
152. Green, S.; Hodges, H. Animal models of anxiety. In: Willner, P., ed. *Behavioural models in psychopharmacology*. Cambridge: C.U.P.; 1991:21-49.
153. Griebel, G. 5-hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacology and Therapeutics* 65: 319-395, 1995.

154. Griebel, G.; Belzung, C.; Misslin, R.; Vogel, E. The free exploratory paradigm: An effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia reducing drugs. *Behav. Pharmacol.* 4:637-644; 1993. (a)
155. Griebel, G.; Blanchard, D. C.; Blanchard, R. J. Evidence that the behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol. Behav.* 5:1255-1260; 1996. (b)
156. Griebel, G.; Blanchard, D. C.; Jung, A.; Masuda, C. K.; Blanchard, R. J. 5-HT_{1A} agonists modulate mouse antipredator defensive behavior differently from the 5-HT_{2A} antagonist pirenperone. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2-3:235-244; 1995.
157. Griebel, G.; Moreau, G. -L.; Jenck, F.; Martin, J. R.; Misslin, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav. Proc.* 29:37-48; 1993. (b)
158. Griebel, G.; Perrault, G.; Sanger, D. J. Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone. *Psychopharmacology. (Berlin)*. 138:1, 55-66, 1998.
159. Griebel, G.; Rodgers, R. J.; Perrault, G.; Sanger, D. J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 57: 817-827; 1997.

160. Griebel, G.; Sanger, D. J.; Perrault, G. The use of the elevated plus-maze to discriminate non-selective and BZ₁ (ω 1) selective benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology*. 124: 245-254, 1996. (a)
161. Griebel, S.; Moreau, J. L.; Jenck, F.; Misslin, R.; Martin, J. R. Acute and chronic treatment with 5-HT uptake inhibitors differentially modulate emotional responses in anxiety models in rodents. *Psychopharmacology*. 113: 463-470, 1994.
162. Haefely, W.; Schaffner, R.; Polc, P.; Pieri, L. General pharmacology and neuropharmacology of propanediol carbamates. *Handbook of experimental pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin, vol. 55(II): 263-283, 1981.
163. Han, J. S. - The neurochemical bases of pain relief by acupuncture. Beijing, Medical Sciences Press of China, 1987.
164. Handley, S. L. Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: Idzikowski, C.; Cowen, P., eds. *Serotonin, sleep and mental disorder*. Petersfield: Wrightson Biomedical; 1991:89-115.
165. Handley, S. L.; McBlane, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 29:129-138; 1993. (a)
166. Handley, S. L.; McBlane, J. W.; Critcheley, M. A. E.; Njung'e, K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav. Brain Res*. 58:203-210; 1993. (b)

167. 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*. 327:1-5; 1984.
168. Handley, S.; McBlane, J. W. Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. *Br. J. Pharmacol* 107: 446, 1992.
169. Hartig, P. R. Molecular biology of 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 10: 64-69, 1989.
170. Heinrichs, S. C.; Pich, E. M.; Miczek, K. A.; Britton, K. T.; Koob, G. F. Corticotrophin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res*. 581:190-197; 1992.
171. Helton, D. R.; Tizzano, J. P.; Monn, J. A.; Schoepp, D. D.; Kallman, M. J. Anxiolytic and side-effect profile of LY354740: a potent, highly selective, orally active agonist for group II metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284:2, 651-660, 1998.
172. Hendrie, C. A.; Eilam, D.; Weiss, S. M. Effects of diazepam and buspirone in two models of anxiety in wild voles (*Microtus socialis*). *J. Psychopharmacology*., Abstract Book. A46:181; 1994.
173. Hilakivi-Clarke, L. A. Injection of vehicle is not a stressor in Porsolt's swim test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42:193-196; 1992.
174. Hodges, H.; Green, S. Evidence for the involvement of brain GABA and serotonin systems in the anticonflict effects of chlordiazepoxide in rats. *Behav Neural Biol* 40: 127-154, 1984.

175. Hodges, H.; Green, S.; Crewes, H.; Mathers, I. Effects of chronic chlordiazepoxide treatment on novel and familiar food preference in rats. *Psychopharmacology*. 75: 305-310, 1981.
176. Hodges, H.; Green, S.; Glenn, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not discrimination. *Psychopharmacology*. 92: 491-504, 1987.
177. Hoehn-Saric, R.; McLeod, D. R. Depression and anxiety: Is there a common etiology? In: DenBoer, J. A.; Sitsen, J. M., eds. *Handbook of depression and anxiety*. New York: Marcel Dekker; 1994: 119-158.
178. Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:21-30; 1996.
179. Hogg, S.; File, S. E. Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49(1):219-222; 1994.
180. Holmes, A.; Rodgers, R. J. Factor analysis of behavioural responses to repeated testing in the plus-maze. *Journal of Psychopharmacology*. 10:[Suppl.] A47, 185, 1996.
181. Howard, J. L.; Pollard, G. T. Effects of buspirone in the Geller-Seifter conflict test with incremental shock. *Drug Dev Res* 19: 37-49, 1990.
182. Hsieh, J.-C.; Tu, C.-H.; Chen, F.-P.; Chen, M.-C.; Yeh, T.-C.; Cheng, H.-C.; Wu, Y.-T.; Liu, R.-S. e Ho, L.-T. - Activation of the hypothalamus characterizes the acupuncture stimulation at the analgesic point in human: a positron emission tomography study. *Neurosci. Lett.*, 307: 105-108, 2001.
183. Humphrey, P. P. A.; Hartig, P.; Hoyer, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 14: 233-236, 1993.

184. Huttunen, P.; Myers, R. D. Tetrahydro-b-Carboline micro-injected into the hippocampus induces an anxiety-like state in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:1733-1738; 1986.
185. Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: Effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology.* 101:27-33; 1990.
186. Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 194:71-76; 1991.
187. Izquierdo, I.; Medina, J. H. GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.* 12:260-265; 1991.
188. Jaffard, R.; Destrade, C.; Cardo, B. Effet de la stimulation de l'hippocampe sur l'évitement passif chez deux lignées de souris. *Physiol. Behav.* 16:233-236; 1991.
189. Jiansan, Y. Localização manual de los puntos de acupuntura. Sección de estudio y enseñanza de acupuntura y moxibustión del instituto de la medicina tradicional China de Beijing. Beijing: Miranguano, [199-]. 91p.
190. Jimenez, G.C.; Cole, E.F.; Samico, A.J.R.; Siqueira, S.W.; Adrião, M.G.F.; Sá, F.B.; Azevedo, G.L.C. Alterações nos tempos de dispnéia, espasmo e óbito em animais de laboratório estimulados pela acupuntura. *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária.* p. 93, 1994.
191. Johnson, N. J. T.; Rodgers, R. J. Ethological analysis of cholecystokinin (CCK_A and CCK_B) receptor ligands in the elevated plus-maze test of anxiety in mice. *Psychopharmacology.* 124: 355-364. 1996.

192. Jones, G. H.; Cole, B. J. Are drug effects in the elevated plus-maze dependent on the baseline level of fear? *Behav. Pharmacol.* 5:87; 1994.
193. June, H. L.; Lewis, M. J. Interactions of Ro 15-4513, Ro 15-1788 (flumazenil) and ethanol on measures of exploration and locomotion in rats. *Psychopharmacology.* 116: 309-316, 1994.
194. Kahn, R. S.; van Praag, H. M.; Wetzler, S.; Asnis, G. M.; Barr, G. Serotonin and anxiety revisited. *Biol Psychiatry.* 23: 189-208. 1988.
195. Kamata, K. Pharmacological studies on the interrelation between the dopaminergic, GABAergic and opioid peptidergic systems in the central nervous system of the rat. *J. Pharmacol. (Japan)* 45, 439-447, 1987.
196. Kapczinski, F.; Curran, H. V.; Gray, J.; Lader, M. Flumazenil has an anxiolytic effect in simulated stress. *Psychopharmacology.* 114: 187-189, 1994.
197. Kassermann, H. P. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. *Psychopharmacology.* 89:31-37; 1986.
198. Kemble, E. D.; Thornton, A. E.; Schultz, L. A. Some fear-potentiating effects of fluprazine hydrochloride in mice. *Aggressive Behavior.* 13: 269-280. 1987.
199. Kidman, A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. *Progress in Neurobiology.* 32:391-402; 1989.
200. Kilts, C. D.; Commissaris, R. L.; Rech, R. H. Comparison of anticonflict drug effects in three experimental animal models of anxiety. *Psychopharmacology.* 74: 290-296, 1981.
201. Kitamura, Y.; XXXXXXX Buspirone enhances immobility in forced swim test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 55(3):445-51, 1996.

202. Klein, D. F. Anxiety reconceptualized. In: Klein, D. F.; Rabkin, J. (eds). Anxiety: new research and changing concepts. Raven Press, New York, 1981. p. 235-262.
203. Kline, P. An easy guide to factor analysis. London: Routledge.
204. Korkmaz, S.; Ljungblad, E.; Wahlström, G. Interaction between flumazenil and the anesthetic effects of hexobarbital in the rat. *Brain Research*. 676, 371-377, 1995.
205. Korpi, E. R.; Kleingoor, C.; Ketterman, H.; Seeburg, P. H. Benzodiazepine-induced motor impairment linked to point mutation in cerebellar GABA_A receptor. *Nature* 361: 356-359, 1993.
206. Kostowski, W.; Plaznik, A.; Stefanski, R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 168:393-396; 1989.
207. Kulkarni, S. K.; Sharma, A. C. Elevated plus-maze : A novel psychobehavioural tool to measure anxiety in rodents. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 31:573-577; 1991.
208. Lader, M. H. Benzodiazepine withdrawal states. In: Trimble (ed) *Benzodiazepines divided*. John Wiley & Sons, Chichester. 1983.
209. Lader, M. H. Benzodiazepines and novel anxiolytics: clinical pharmacology, dependence and withdrawal. In: Rodgers, R. J.; Cooper, S. J., eds. *5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: their behavioural pharmacology*. Chichester: J. Wiley & Sons Ltd; 1991:343-363.
210. Lamberty, Y.; Gower, A. J. Arm width and brightness modulation of spontaneous behaviour of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 3:439-444; 1996.

211. Lapin, I. P. Only controls: effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2:73-77; 1995.
212. Lauritzen, M. Cerebral Blood flow in migraine and cortical spreading depression. *Acta Neurol Scand Suppl* 113: 140, 1987.
213. LeDoux, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Cur. Op. Neurobiol.* 2:191-197; 1992.
214. LeDoux, J. E. Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology.* 46:209-235; 1995.
215. Lee, C.; Rodgers, R. J. Antinociceptive effects of plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology.* 102:507-513; 1990.
216. Lee, C.; Rodgers, R. J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioral responses to the elevated plus-maze in mice. *Behav. Pharmacol.* 2:491-496; 1991.
217. Lee, E. H. Y.; Lin, W. R.; Chen, H. Y.; Shiu, W. H.; Liang, K. C. Fluoxetine and 8-OH-DPAT in the lateral septum enhances and impairs retention of an inhibitory avoidance response in rats. *Physiol. Behav.* 51:681-688; 1992.
218. Liao, S. J. - Recent Advances in the understanding of acupuncture. *Yale J Biol Med*, 51: 55-65, 1978.
219. Lister, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.* 46:321-340; 1990.
220. Lister, R. G. The amnesic action of benzodiazepines in man. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9:87-94; 1985.

221. Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92:180-185; 1987.
222. Lorenz, K. The fashionable fallacy of dispensing with description. *Naturwissenschaften*. 60:1-9; 1973.
223. Lucki, I. 5-HT_{1A} receptors and behaviour. *Neurosci Behav Ver* 16: 83-93. 1992.
224. Lüddens, H.; Wisden, W. Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits. *Trends Pharmacol Sci* 12: 49-51, 1991.
225. Maciocia, G. Os fundamentos da medicina chinesa. São Paulo : Roca, 1996. 658 p.
226. Mann, F. Acupuntura : a arte chinesa de curar. São Paulo : Hemus, 1982. 208 p.
227. Marks, I. M. Fears, phobias, and rituals: panic, anxiety and their disorders. New York: OUP; 1987.
228. Marks, J. The benzodiazepines. Use, overuse, misuse, abuse, MTP Press, Lancaster. 1978.
229. Martin, J. R.; Moreau, J. L.; Jenck, F.; Cumin, R. Acute and chronic administration of buspirone fails to yield anxiolytic-like effects in a mouse operant punishment paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 46: 905-910, 1993.
230. Mason, P.; Skinner, J.; Luttinger, D. Two tests in rats for antianxiety attenuating antidepressants. *Psychopharmacology*. 92: 30-34, 1987.

231. Masur, J. A técnica do "Open Field" como medida da reatividade emocional de ratos. Separata da Revista de Psicologia Normal e Patológica. 3-4:195-220; 1970.
232. Mayer, D. G.; Price, D. D. e Raffi, A. - Antagonism of acupuncture analgesia in man by narcotic antagonist naloxone. *Brain Res.*, 121: 368-372, 1977.
233. McBlane, J. W.; Handley, S. L. Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology*. 116: 173-182, 1994.
234. McCreary, A. C.; McBlane, J. W.; Spooner, H. A.; Handley, S. L. 5-HT system and anxiety: multiple mechanisms in the elevated plus-maze. *Polish J. Pharmacol.* 48:1-12; 1996.
235. McEntee, W. J.; Crook, T. H. Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*. 103:143-149; 1991.
236. Millan, M. J.; Hjorth, S.; Samanin, R.; Schreiber, R.; Jaffard, R.; De Ladonchamps, B.; Veiga, S.; Goument, B.; Peglion, J. L.; Spedding, M.; Brocco, M. S 15535, a novel benzodioxopiperazine ligand of serotonin (5-HT)_{1A} receptors: II. Modulation of hippocampal serotonin release in relation to potential anxiolytic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1:148-161; 1997.
237. Misslin, R.; Cigrang, M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? *Behav. Process.* 12:45-50; 1986.
238. Miyazaki, S.; Imaizumi, M.; Machida, H. The effects of anxiolytics and anxiogenics on evaluation of learning and memory in an elevated plus-maze test in mice. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2:121-127; 1995.

239. Molewijk, H. E.; Van der Poel, A. M.; Olivier, B. The ambivalent behavior 'stretched attend posture' as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. *Psychopharmacology*. 121:81-90; 1995.
240. Montgomery, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48:254-260; 1955.
241. Moreau, J. L.; Kilpatrick, G.; Jenck, F. Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. *Neuroreport* 8:7, 1697-1701, 1997.
242. Moser, P. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology*. 99: 48-53, 1989.
243. Moskowitz, M. A. Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci* 13: 307-311, 1992.
244. Motta, V.; Maissonette, S.; Morato, S.; Castrechini, P.; Brandao, M. L. Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 107:135-139; 1992.
245. Nagy, J.; Zambo, K.; Desci, L. Anti-anxiety action of diazepam after intra-amygdaloid application in the rat. *Neuropharmacology*. 18:573-576; 1973.
246. Nastiti, K.; Benton, D.; Brain, P. F. The effects of compounds acting at the benzodiazepine receptor complex on the ultrasonic calling of mouse pups. *Behav Pharmacol* 2: 121-128, 1991.
247. Nogueira, E.; Rosa, G. J.; Haraguchi, M.; Vassilieff, V. S. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. *J Ethnopharmacol* 61:2, 111-117, 1998.
248. Nutt, D. J. Anxiety and its therapy today and tomorrow. In: Briley, M.; File, S. E. (eds) *New concepts in anxiety*. London: MacMillan, 1991. p. 1-12.

249. Nutt, D. J. The pharmacology of human anxiety. *Pharmacology and Therapeutics*. 47: 233-266, 1990.
250. Nutt, D. J.; Glue, P. Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: A psychopharmacological perspective. *Pharmacol. Ther.* 44:309-334; 1989.
251. Olesen, J.; Friberg, J.; Olsen, T. S. Timing and topography of cerebral blood flow, aura and headache during migraine attacks. *Ann Neurol* 28: 791-798, 1990.
252. Olivier, B.; Mos, J.; van Oorschot, R.; Hen, R. Serotonin receptors and animal models of aggressive behavior. *Pharmacopsychiatry*. 28:[Suppl.] 80-90, 1995.
253. Olton, D. S.; Papas, B. C. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychology*. 17:669-682; 1979.
254. Paredes, R. G.; Ågmo, A. Gaba and behavior: the role of receptor subtypes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 16: 145-170, 1992.
255. Peatfield, R. Drugs and the treatment of migraine. *Trends Pharmacol Sci* 9: 141-145, 1988.
256. 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*. 14:149-167; 1985.
257. Peroutka, S. J. 5-Hydroxytryptamine receptors subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci* 11: 496-500, 1988.
258. Pich, E. M.; Samanin, R. Disinhibitory effects of buspirone and low doses of sulpiride and haloperidol in two experimental anxiety models in rats: possible role of dopamine. *Psychopharmacology*. 89: 125-130, 1986.

259. Pick, C. G. Strain differences in mice antinociception: relationship between alprazolam and opioid receptor subtypes. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 3:201-205; 1996.
260. Pinel, J. P. J.; Mana, M. J. Adaptive interactions of rats with dangerous inanimate objects: support for a cognitive theory of defensive behavior. In: Blanchard, R. J.; Brain, P. F.; Parmigiani, S.; Blanchard, D. C., eds. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Dordrecht: Kluwer; 1989:137-155.
261. Pinel, J. P. J.; Treit, D. The conditioned defensive burying paradigm and behavioral neuroscience. In: Robinson, T., ed. *Behavioral approaches to brain research*. Oxford: OUP; 1983:212-234.
262. Pokk, P.; Kivastik, T.; Sobol, D.; Liljequist, S.; Zharkovsky, A. Is upregulation of benzodiazepine receptors a compensatory reaction to reduced GABAergic tone in the brain of stressed mice? *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 354: 703-708, 1996. (a)
263. Pokk, P.; Zharkovsky, A. Ro 15-4513 potentiates, instead of antagonizes, ethanol-induced sleep in mice exposed to small platform stress. *Eur J Pharmacol* 317: 15-20, 1996. (b)
264. Pokk, P.; Zharkovsky, A. The effects of drugs acting at GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor complex on the behaviour of sleep-deprived mice. *Pharmacology & Toxicology*. 76, 23-28, 1995.

265. Pokk, P.; Zharkovsky, A. The effects of flumazenil, Ro 15-4513 and β -CCM on the behaviour of control and stressed mice in the plus-maze test. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 48, 2, 253-261, 1997.
266. Pomeranz, B. e Chiu, D. - Naloxone blocks acupuncture analgesia and causes hyperalgesia: endorphine is implicated. *Life Sci.*, 19: 1757-1762, 1976.
267. Prado de Carvalho, L.; Venault, P.; Rossier, J.; Chapouthier, G. Anxiogenic properties of convulsive agents. *Soc Neurosci Abstr* 9: 128, 1983.
268. Quartermain, D.; Clemente, J.; Shemer, A. 5-HT_{1A} agonists disrupt memory of fear conditioning in mice. *Biol. Psychiatry*. 33:247-254; 1993.
269. Quintero, S.; Henney, H.; Lawson, P.; Mellanby, J.; Gray, J. A. The effects of compounds related to γ -aminobutyrate and benzodiazepine receptors on behavioural responses to anxiogenic stimuli in the rat: punished barpressing. *Psychopharmacology*. 85: 244-251, 1985.
270. Rabow, L. E.; Russek, S. J.; Farb, D. H. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse*. 21: 189-274, 1995.
271. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Farmacologia*, 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
272. Rasmussen, K. J.; Schneider, H. H.; Petersen, E. N. Sodium valproate exerts anti-conflict activity in rats without any concomitant rise in forebrain GABA levels. *Life Sci* 29: 2163-2170, 1981.

273. Ratner, S. C. Comparative aspects of hypnosis. In: Gordon, J. E., eds. Handbook of clinical and experimental hypnosis. New York: Macmillan; 1967: 550-587.
274. Reddy, D. S.; Kulkarni, S. K. Role of GABA-A and mitochondrial diazepam binding inhibitor receptors in the anti-stress activity of neurosteroids in mice. *Psychopharmacology*. (Berlin) 3:280-292; 1996.
275. Rex, A.; Fink, H.; Marsden, C. A. Effects of BOC-CCK-4 and L 365,260 on cortical 5-HT release in guinea-pigs on exposure to the elevated plus-maze. *Neuropharmacol.* 33:559-565; 1994.
276. Rickels, K.; Downing, R.; Schweizer, E.; Hassman, H. Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiat* 50: 884-895, 1993.
277. Rochford, J.; Beaulieu, S.; Rousse, I.; Glowa, J. R.; Barden, N. Behavioral reactivity to aversive stimuli in a transgenic mouse model of impaired glucocorticoid (type II) receptor function: effects of diazepam and FG-7142. *Psychopharmacology* (Berlin). 132:2, 145-152, 1997.
278. Rodgers, R. J. Effects of benzodiazepine and 5-HT receptor ligands on aggression and defence in animals. In: Rodgers, R. J.; Cooper, S. J. (eds). 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: their comparative behavioural pharmacology. Chichester: Wiley, 1991. p. 195-231. (a)
279. Rodgers, R. J. ; Cutler, M. G.; Jackson, J. E. Behavioural effects in mice of subchronic buspirone, ondansetron and tianeptine. II. The elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 56: 295-303, 1997. (b)

280. Rodgers, R. J. ; Cutler, M. G.; Jackson, J. E. Behavioural effects in mice of subchronic chlordiazepoxide, maprotiline and fluvoxamine. II. The elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 57: 127-136; 1997. (c)
281. Rodgers, R. J. A step in the right direction. *J. Psychopharmacology*. 5:316-319; 1991. (b)
282. Rodgers, R. J.; Cao, B. J.; Dalvi, A.; Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 3: 289-304; 1997. (a)
283. Rodgers, R. J.; Cole, J. C. Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test. *European Journal of Pharmacology*. 261: 321-325, 1994. (d)
284. Rodgers, R. J.; Cole, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (eds). *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: John Wiley and Sons, 1994. p. 9-44. (a)
285. Rodgers, R. J.; Cole, J. C. Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav*. 54:729-736; 1993. (b)
286. Rodgers, R. J.; Cole, J. C.; Aboualfa, K.; Stephenson, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 52,4:805-813; 1995. (a)
287. Rodgers, R. J.; Cole, J. C.; Cobain, M. R.; Daly, P.; Doran, P. J.; Eells, J. R.; Wallis, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behavioural Pharmacology*. 3:621-634; 1992. (a)

288. Rodgers, R. J.; Cole, J. C.; Davies, A. Anti-anxiety and behavioural suppressant effects of the novel 5-HT_{1A} receptor agonist, flesinoxan. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 48: 959-963, 1994. (b)
289. Rodgers, R. J.; Cole, J. C.; Tredwell, J. M. Profile of action of 5-HT₃ receptor antagonists, ondansetron and WAY 100289, in the elevated plus-maze test of anxiety of mice. *Psychopharmacology*. 117:306-312; 1995. (b)
290. Rodgers, R. J.; Dalvi, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 21: 801-810, 1997. (d)
291. Rodgers, R. J.; Johnson, N. J. Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 59:1, 221-232, 1998.
292. Rodgers, R. J.; Johnson, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2:297-303; 1995. (c)
293. Rodgers, R. J.; Johnson, N. J. T.; Champion, A. J.; Mills, S. Modulation of plus-maze behaviour in mice by the preferential D₃ receptor agonist, 7-OH-DPAT. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:79-84; 1996.
294. Rodgers, R. J.; Johnson, N. J. T.; Norton, S. J.; Cole, J. C. Effects of ritanserine and 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl aminopropane (DOI) in the murine elevated plus-maze test of anxiety: an ethopharmacological study. *J. Psychopharmacol.* 9:38-42; 1995. (d)
295. Rodgers, R. J.; Lee, C.; Shepherd, J. K. Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon

- treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology (Berlin)* 106:102-110; 1992. (b)
296. Rodgers, R. J.; Nikulina, E. M.; Cole, J. C. Dopamine D₁ and D₂ receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 49:985-995; 1994. (c)
297. Rodgers, R. J.; Shepherd, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology (Berlin)* 113:237-242; 1993. (a)
298. Rodgers, R.J.; Naloxone administration following brief exposure to novelty reduces activity and rearing in mice upon 24-h retest: a conditioned aversion? *Psychopharmacology (Berl)*; 82(4):322-6, 1984.
299. Rouillet, P.; Lassalle, J. M. Behavioural strategies, sensorial processes and hippocampal mossy fibre distribution in radial maze performance in mice. *Behav. Brain Res.* 48:77-85; 1992.
300. Rouillet, P.; Lassalle, J. M. Spontaneous exploration, response plus position learning and hippocampal mossy fibre distribution: A correlational study. *Behav. Process* 29:217-228; 1993.
301. Rowan, M. J.; Cullen, W. K.; Moulton, B. Buspirone impairment of performance of passive avoidance and spatial learning tasks in rat. *Psychopharmacology*. 100:393-398; 1990.
302. Samico, A.J.R.; Cole, E.F.; Jimenez, G.C.; Sá, F.B.; Siqueira, S.W.; Adrião, M.G.F.; Azevedo, G.L.C. Analgesia em camundongos *Mus musculus* – albino suíço promovida pela acupuntura. *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. p. 93 ,1994.

303. Samico, A.J.R.; Cole, E.F.; Jimenez, G.C.; Sá, F.B.; Siqueira, S.W.; Adrião, M.G.F.; Azevedo, G.L.C. Efeitos sinérgicos do ponto extra Yin Tang em analgesia de animais de laboratório. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. p. 84, 1994.
304. Sanger, D. J. GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. *Life Sci.* 36: 1503-1513, 1985.
305. Sato, T.; Takeshige, C. e Shimizu, S. - Morphine analgesia mediated by activation on the acupuncture-analgesia-producing system. *Acupunct. Electrother. Res.*, 16: 13-16, 1991.
306. Sayin, U.; Purali, N.; Ozkan, T.; Altung, T.; Buyukdevrim, S. Vigabatrin has an anxiolytic effect in the elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 43: 529-535, 1992.
307. Schefke, D. M.; Fontana, D. J.; Commissaris, R. L. Anti-conflict efficacy of buspirone following acute versus chronic treatment. *Psychopharmacology.* 99: 427-429, 1989.
308. Schweizer, E.; Rickles, K. Serotonergic anxiolytics: a review of their clinical efficacy. In: Rodgers, R. J.; Cooper, S. J. (eds). 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: their comparative behavioural pharmacology. Chichester: Wiley, 1991. p. 31-57.
309. Shaji, A. V.; Kulkarni, S. K. Evidence of GABAergic modulation in melatonin-induced short-term memory deficits and food consumption. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20:4, 311-319, 1998.

310. Sharma, A. C.; Kulkarni, S. K. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 16:117-125; 1992.
311. Shephard, R. A. Behavioral effects of GABA agonists in relation to anxiety and benzodiazepine action. *Life Sci.* 40: 2429-2436, 1987.
312. Shephard, R. A. Neurotransmitters, anxiety and benzodiazepines: a behavioral review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 10: 449-461, 1986.
313. Shephard, R. A.; Hamilton, M. S. Chlordiazepoxide and valproate enhancement of saline drinking by non-deprived rats: effects of bicuculine, picrotoxin and Ro 15-1788. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 33: 285-290, 1989.
314. Shephard, R. A.; Toal, L.; Leslie, J. C. Effects of agonists and antagonists at the GABA/benzodiazepine receptor on conditioned suppression in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 36: 39-43, 1990.
315. Shepherd, J. K. Preliminary evaluation of an elevated 'zero-maze' as a model of anxiety in laboratory rats. *J. Psychopharmacology.* 6:A56, 223; 1992.
316. Shepherd, J. K.; Grewal, S. S.; Fletcher, A.; Bill, D. J.; Dourish, C. T. Behavioural and pharmacological characterization of the elevated zero-maze as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology.* 116: 56-64. 1994.
317. Sherif, F.; Harro, J.; El-hwuegi, A.; Orelund, L. Anxiolytic-like effect of the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin (gammavinyl GABA) on rat exploratory behaviour. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 49: 801-805, 1994. (b)

318. Sherif, F.; Orelund, L. Effects of chronic treatment with the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin on exploratory behaviour in rats. *Behav Brain Res* 63: 11-15, 1994. (a)
319. Shimada, T.; Matsumoto, K.; Osanal, M.; Matsuda, H.; Terasawa, K.; Watanabe, H. The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. *Gen Pharmacol* 26: 205-210, 1995.
320. Sieghart, W. GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 13: 446-450, 1992.
321. Sieghart, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 47: 181-234, 1995.
322. Silva, N. V. *Introdução à análise de dados qualitativos.* 1 ed. São Paulo: Vértice, 1990. p. 53-138.
323. Simiand, J.; Keane, P. E.; Morre, M. The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. *Psychopharmacology.* 84: 48-53, 1984.
324. Simmonds, M. A. Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. *Trends Neurosci* 6: 279-281, 1983.
325. Singh, N.; Sharma, A.; Singh, M. Possible mechanism of alprazolam-induced amnesia in mice. *Pharmacology.* 56:1, 46-50, 1998.
326. Soubrie, P.; Thiebot, M. H.; Simon, P. Enhanced suppressive effects of aversive events induced in rats by picrotoxin: possibility of a GABA control on behavioral inhibition. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 10: 463-469, 1979.

327. Steenbergen, H. L.; Farabollini, F.; Heinsbroek, R. P. W.; Van de Poll, N. E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Physiol. Behav.* 48:571-576; 1990.
328. Stephens, D. N.; Andrews, J. S. Screening for anxiolytic drugs. In: Willner, P., ed. *Behavioural models in psychopharmacology*. Cambridge: C.U.P.; 1991: 50-75.
329. Stone, E. A.; Manavalan, S. J.; Zhang, Y.; Quatermain, D. Beta adrenoceptor blockade mimics effects of stress on motor activity in mice. *Neuropsychopharmacology*. 12: 65-71, 1995.
330. Stutzmann, J.; Böhme, G. A.; Cochon, M.; Roux, M.; Blanchard, J. Proconflict and electrocorticographic effects of drugs modulating GABAergic neurotransmission. *Psychopharmacology*. 91: 74-79, 1987.
331. Takeshige, C.; Kobori, M.; Hishida, F.; Luo, C.-P. e Usami, S. - Analgesia inhibitory system involvement in nonacupuncture point-stimulation-produced analgesia. *Brain Res. Bull.*, 28: 379-391, 1992a.
332. Takeshige, C.; Oka, K.; Mizuno, T.; Hisamitsu, T.; Luo, C.-P.; Kobori, M.; Mera, H. e Fang, T.-Q. - The acupuncture point and its connecting central pathway for producing acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull.*, 30: 53-67, 1992c.
333. Takeshige, C.; Sato, T. e Komugi, H. - Role of periaqueductal central gray in acupuncture analgesia. *Acupunct. Electrother. Res.*, 5: 323-337, 1980.
334. Takeshige, C.; Sato, T.; Mera, T.; Hisamitsu, T. e Fang, J. - Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. *Brain Res. Bull.*, 29: 617-634, 1992b.

335. Takeshige, C.; Tsuchiya, M.; Guo, S.-Y. e Sato, T. - Dopaminergic transmission in the hypothalamic arcuate nucleus to produce acupuncture analgesia in correlation with pituitary gland. *Brain Research Bulletin*, 26: 113-122, 1991.
336. Taylor, D. P.; Moon, S. L. Buspirone and related compounds as alternative anxiolytics. *Neuropeptides*. 19: [Suppl. 1] 15-19, 1991.
337. Thiebot, M. H. Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9:95-100; 1985.
338. Thiébot, M. H.; Laporte, A. M.; Soubrié, P. Microgram doses of diazepam do not induce proconvulsant or proconflict effects in rodents. *Psychopharmacology*. 93: 389-392, 1987.
339. Thorpe, W. H. The origins and rise of ethology. London: Heinemann; 1979.
340. Tinbergen, N. On the aims and methods of ethology. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 20:410-433; 1963.
341. Toal, L.; Leslie, J. C.; Shephard, R. A. Effects of chlordiazepoxide and putative anxiogenics on conditioned suppression in rats. *Physiol Behav* 49: 1085-1090, 1991.
342. Traber, J.; Glaser, T. 5-HT_{1A} receptor-related anxiolytics. *Trends Pharmacol Sci* 8: 432-437, 1987.
343. Treit, D. Anxiolytic effects of benzodiazepines and 5-HT_{1A} agonists: animal models. In: Rodgers, R. J.; Cooper, S. J. (eds). 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: their comparative behavioural pharmacology. Chichester: Wiley, 1991. p. 107-132.

344. Treit, D. Ro 15-1788, CGS 8216, picrotoxin, and pentylenetetrazol: do they antagonize anxiolytic drug effects through an anxiogenic action? *Brain Res Bull* 19: 401-405, 1987.
345. Treit, D. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. In: DenBoer, J. A.; Sitsen, J. M., eds. *Handbook of depression and anxiety*. New York: Marcel Dekker; 1994:201-224.
346. Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44:463-469; 1993.
347. Trullas, R.; Skolnick, P. Differences in fear-motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*. 111:323-331; 1993.
348. Tyrer, P.; Tyrer, J. Antidepressive drugs for the treatment of anxiety disorders—and vice versa. In: DenBoer, J. A.; Sitsen, J. M., eds. *Handbook of depression and anxiety*. New York: Marcel Dekker; 1994:497-514.
349. Urbancic, M.; Gadek, M. A.; Marczyński, T. J. Chronic exposure to flumazenil: anxiolytic effect and increased exploratory behavior. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 35: 503-509, 1990.
350. Vasar, E.; Peuranen, E.; Ööpik, T.; Harro, J.; Männistö, P. T. Ondansetron, a antagonist of 5-HT₃ receptors, antagonizes the anti-exploratory effect of caerulein, an agonist of CCK receptors, in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)* 110:213-218; 1993.
351. Venault, P.; Chapouthier, G.; Prado de Carvalho, L.; Simiand, J.; Morre, M.; Dodd, R. H.; Rossier, J. Benzodiazepines impairs and b-carboline enhances performance in learning and memory tasks. *Nature*. 321:864-866; 1986.

352. Wei-Kang, F. The story of chinese acupuncture and moxibustion. Peking : Foreign Languages Press, 1975.
353. Wen, T. S. Acupuntura clássica chinesa. 10. ed. São Paulo : Cultrix, 1985. 227 p.
354. Willner, P. Behavioural models in psychopharmacology. In: Willner, P., ed. Behavioural models in psychopharmacology. Cambridge: C.U.P.; 1991: 3-18.
355. Winslow, J. T.; Insel, T. R. The infant rat separation paradigm: a novel test for novel anxiolytics. Trends Pharmacol. Sci. 12:402-404; 1991.
356. Woods, J. H.; Katz, J. L.; Winger, G. Abuse liability of benzodiazepines. Pharm Ver 39: 251-413. 1987.
357. Woolf, H. G. Headache and other head pain. Oxford University Press, New York, 1963.
358. Wright, I. K.; Heaton, M.; Upton, N.; Marsden, C. A. Comparison of acute and chronic treatment of various serotonergic agents with those of diazepam and idozoxan in the rat elevated X-maze. Psychopharmacology (Berlin) 107:405-414; 1992.
359. Wu, M.-T.; Hsieh, J.-C.; Xiong, J.; Pan, H.-B.; Chen, Y.-C. I.; Tsai, G.; Rosen, B. R. e Kwong, K. K. - Central nervous pathways for acupuncture stimulation: localization of processing with functional MR imaging of the brain - Preliminary experience. *Neuroradiology*, 212: 131-141, 1999.
360. Yang, X.-M.; Gorman, A. L.; Dunn, A. J.; Goeders, N. E. Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: Neurochemical and behavioral studies. Pharmacol. Biochem. Behav. 41:643-650; 1992.

361. Yannielli, P. C.; Kanterewicz, B. L.; Cardinali, D. P. Daily rhythms in spontaneous and diazepam-induced anxiolysis in Syrian hamsters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:651-656; 1996.
362. Zakusov, V. V.; Ostrovskaya, R. V.; Kozhechkin, S. N.; Markovic, V. V.; Molodavkin, G. M.; Voronina, T. A. Further evidence for GABAergic mechanisms in the action of benzodiazepines. *Arch Int Pharmacodyn* 229: 313-326, 1977.
363. Zangrossi, H., Jr.; File, S. E. Behavioural consequences in animals tests of anxiety and exploration of exposure to cat odour. *Brain Res. Bull.* 29:381-388; 1992. (a)
364. Zangrossi, H., Jr.; File, S. E. Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:1195-1200; 1992. (b)
365. Zifa, E.; Fillion, G. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharm Ver* 44: 401-458, 1992.

ABSTRACT

PAPER OF THE ACUPUNCTURE IN THE LEVELS OF ANXIETY OF SUBMITTED MICE TO THE ELEVATED PLUS-MAZE: IMPLICATIONS WITH OPIOID'S, GABAERGIC'S AND HTERGIC'S PARTICIPATION.

SUMMARY

This work objectified to study the paper of the acupuncture in the levels of anxiety of mice submitted to the elevated plus-maze (EPM) and its implications with the participation of opioid gabaergic and htergic mechanisms. It was used 170 animals, everybody males, with 12-15 weeks, housed jointly and under conditions of light cycle reverted to the every 12 hours (worked 19 h.), for five weeks you foresaw to the test EPM, that was accomplished of 10-14 h., being totally (5 min.) engraving in video for posterior analysis, for trained individual that not the investigator. The mice was separate randomicaly in 13 groups, that submitted the application of EPM 45

min. After the treatments they have been made. The behavior of the animals was evaluated according to the traditional parameters (Lister, 1987) of % n⁰ and % t, submitted to a variance analysis. The groups acupuncture and diazepam accused differences statistic significant of the group control/salina, although, to each other, have not had a comparative posture significant, what drives the conclusion that both groups possess anxiety effect of the same magnitud. The involvement of the opioid system was also verified in the mechanism of action of the acupuncture, because the naloxona totally reverted the anxiety effects of the same.

ANEXOS

TABELAS

Tabela 1. GRUPO DE TRATAMENTO A

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	N ^o	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^e	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
1	6	9	15	40.00	49	120	169	131	16.33
5	12	10	22	54.55	146	90	236	64	48.67
9	5	7	12	41.67	84	111	195	105	28.00
13	6	11	17	35.29	79	139	218	82	26.33
17	4	7	11	36.36	64	153	217	83	21.33
21	5	11	16	31.25	35	157	192	108	11.67
25	1	2	3	33.33	78	137	215	85	26.00
29	7	10	17	41.18	78	128	206	94	26.00
33	2	9	11	18.18	34	174	208	92	11.33
37	3	6	9	33.33	35	116	151	149	11.67
41	1	8	9	11.11	14	161	175	125	4.67
45	2	8	10	20.00	18	172	190	110	6.00
49	14	20	34	41.18	61	121	182	118	20.33
53	6	10	16	37.50	71	139	210	90	23.67
57	2	10	12	16.67	10	193	203	97	3.33
T	76	138	214	491.60	856	2111	2967	1533	285.33
X	5.07	9.20	14.27	32.77	57.07	140.73	197.80	102.20	19.02

Tabela 2. GRUPO DE TRATAMENTO B

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% nº	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
4	6	5	11	54.55	65	202	267	33	21.67
8	9	7	16	56.25	158	77	235	65	52.67
12	6	5	11	54.55	87	125	212	88	29.00
16	5	7	12	41.67	94	114	208	92	31.33
20	5	5	10	50.00	114	103	217	83	38.00
24	7	6	13	53.85	96	133	229	71	32.00
28	5	5	10	50.00	64	103	167	133	21.33
32	5	11	16	31.25	89	116	205	95	29.67
36	8	8	16	50.00	77	120	197	103	25.67
40	2	3	5	40.00	100	126	226	74	33.33
44	2	8	10	20.00	125	69	194	106	41.67
48	3	6	9	33.33	66	94	160	140	22.00
52	2	7	9	22.22	122	53	175	125	40.67
56	5	6	11	45.45	80	133	213	87	26.67
60	22	5	27	81.48	223	48	271	29	74.33
T	92	94	186	684.60	1560	1616	3176	1324	520.01
X	6.13	6.27	12.40	45.64	104.00	107.73	211.73	88.27	34.67

Tabela 3. GRUPO DE TRATAMENTO C

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	N ^o	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^o	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	t _A + t _F (Seg.)
3	8	4	12	66.66	209	49	258	42	69.67
7	11	9	20	55.00	130	127	257	43	43.33
11	3	3	6	50.00	195	59	254	46	65.00
15	6	8	14	42.86	78	144	222	78	26.00
19	4	3	7	57.14	125	138	263	37	41.67
23	10	7	17	58.82	158	88	246	54	52.67
27	16	6	22	72.73	213	63	276	24	71.00
31	3	5	8	37.50	36	190	226	74	12.00
35	6	2	8	75.00	224	51	275	25	74.67
39	7	5	12	58.33	192	76	268	32	64.00
43	11	6	17	64.71	148	85	233	67	49.33
47	7	10	17	41.18	113	109	222	78	37.67
51	10	9	19	52.63	121	104	225	75	40.33
55	13	4	17	76.47	223	58	281	19	74.33
59	13	6	19	68.42	207	66	273	27	69.00
T	128	87	215	877.46	2372	1407	3779	721	790.67
X	8.53	5.80	14.33	58.50	158.13	93.80	251.93	48.07	52.71

Tabela 4. GRUPO DE TRATAMENTO D

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% nº	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
2	2	5	7	28.57	56	117	173	127	18.67
6	6	9	15	40.00	147	65	212	88	49.00
10	1	10	11	9.09	4	171	175	125	1.33
14	0	6	6	0	0	167	167	133	0.00
18	7	13	20	35.00	57	153	210	90	19.00
22	2	8	10	20.00	14	174	188	112	4.67
26	1	4	5	20.00	10	114	124	176	3.33
30	5	4	9	55.56	128	104	232	68	42.67
34	9	9	18	50.00	118	108	226	74	39.33
38	3	12	15	20.00	22	164	186	114	7.33
42	2	5	7	28.57	38	166	204	96	12.67
46	4	4	8	50.00	86	88	174	126	28.67
50	14	14	28	50.00	126	117	243	57	42.00
54	2	5	7	28.57	34	157	191	109	11.33
58	1	7	8	12.50	38	150	188	112	12.67
T	59	115	174	447.86	878	2015	2893	1607	292.67
X	3.93	7.67	11.60	29.86	58.53	134.33	192.87	107.13	19.51

Tabela 5. GRUPO DE TRATAMENTO E

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% nº	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
1	6	9	15	40.00	92	123	215	85	30.67
3	13	9	22	59.09	158	84	242	58	52.67
5	8	9	17	47.06	124	130	254	46	41.33
7	8	7	15	53.33	158	96	254	46	52.67
9	10	11	21	47.62	129	119	248	52	43.00
11	6	7	13	46.15	100	107	207	93	33.33
13	4	7	11	36.36	63	130	193	107	21.00
15	7	8	15	46.67	114	148	262	38	38.00
17	8	8	16	50.00	192	82	274	26	64.00
19	8	8	16	50.00	119	122	241	59	39.67
21	10	15	25	40.00	131	126	257	43	43.67
23	12	5	17	70.59	162	97	259	41	54.00
25	7	7	14	50.00	88	126	214	86	29.33
27	7	10	17	41.18	90	137	227	73	30.00
29	7	9	16	43.75	99	116	215	85	33.00
T	121	129	250	721.80	1819	1743	3562	938	606.34
X	8.07	8.60	16.67	48.12	121.27	116.20	237.47	62.53	40.42

Tabela 6. GRUPO DE TRATAMENTO F

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% nº	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
1	8	8	16	50.00	11	133	244	56	3.67
6	11	5	16	68.75	172	71	243	57	57.33
11	7	12	19	36.84	106	149	255	45	35.33
16	9	9	18	50.00	154	90	244	56	51.33
21	10	5	15	66.67	154	75	229	71	51.33
26	18	13	31	58.06	166	110	276	24	55.33
31	9	9	18	50.00	109	135	244	56	36.33
36	12	14	26	46.15	111	166	277	23	37.00
41	9	9	18	50.00	126	123	249	51	42.00
46	4	8	12	33.33	87	180	267	33	29.00
51	11	9	20	55.00	155	102	257	43	51.67
56	9	10	19	47.37	118	136	254	46	39.33
T	117	111	228	612.17	1469	1470	3039	561	489.65
X	9.75	9.25	19.00	51.01	122.42	122.50	253.25	46.75	40.80

Tabela 7. GRUPO DE TRATAMENTO G

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% nº	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
4	8	8	16	50.00	125	112	237	63	41.67
9	2	16	18	11.11	43	220	263	37	14.33
14	5	11	16	31.25	58	151	209	91	19.33
19	11	9	20	55.00	113	114	227	73	37.67
24	13	13	26	50.00	128	140	268	32	42.67
29	7	7	14	50.00	132	113	245	55	44.00
34	1	14	15	6.67	32	238	270	30	10.67
39	1	12	13	7.69	26	260	286	14	8.67
44	7	10	17	41.18	81	156	237	63	27.00
49	5	6	11	45.45	72	154	226	74	24.00
54	6	8	14	42.86	104	172	276	24	34.67
59	5	10	15	33.33	63	185	248	52	21.00
T	71	124	195	424.54	977	2015	2992	608	325.68
X	5.92	10.33	16.25	35.38	81.42	167.92	249.33	50.67	27.14

Tabela 8. GRUPO DE TRATAMENTO H

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^o	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
2	8	7	15	53.33	137	90	227	73	45.67
4	8	12	20	40.00	103	150	253	47	34.33
6	11	12	23	47.83	123	145	268	32	41.00
8	7	13	20	35.00	66	120	186	114	22.00
10	2	16	18	11.11	18	203	221	79	6.00
12	10	14	24	41.67	79	125	204	96	26.33
14	8	7	15	53.33	80	156	236	64	26.67
16	4	9	13	30.77	57	195	252	48	19.00
18	3	14	17	17.65	13	201	214	86	4.33
20	1	13	14	7.14	45	250	295	5	15.00
22	7	7	14	50.00	110	147	257	43	36.67
24	6	9	15	40.00	100	126	226	74	33.33
26	8	10	18	44.44	65	146	211	89	21.67
28	10	11	21	47.62	127	97	224	76	42.33
30	2	12	14	14.29	12	187	199	101	4.00
T	95	166	261	534.17	1135	2338	3473	1027	378.33
X	6.33	11.07	17.40	35.61	75.67	155.87	231.53	68.47	25.22

Tabela 9. GRUPO DE TRATAMENTO I

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^o	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
3	9	8	17	52.94	120	129	249	51	40.00
8	5	6	11	45.45	51	224	275	25	17.00
13	8	14	22	36.36	103	165	268	32	34.33
18	9	8	17	52.94	136	134	270	30	45.33
23	8	7	15	53.33	180	92	272	28	60.00
28	13	10	23	56.52	141	89	230	70	47.00
33	8	11	19	42.10	111	137	248	52	37.00
38	6	8	14	42.86	77	221	298	2	25.67
43	15	13	28	53.57	144	107	251	49	48.00
48	4	9	13	30.77	83	180	263	37	27.67
53	7	8	15	46.67	170	105	275	25	56.67
58	10	10	20	50.00	153	103	256	44	51.00
T	102	112	214	563.51	1469	1686	3155	445	489.67
X	8.50	9.33	17.83	46.96	122.42	140.50	262.92	37.08	40.81

Tabela 10. GRUPO DE TRATAMENTO J

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	N ^o	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^o	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
2	11	12	23	47.83	117	130	247	53	39.00
7	9	13	22	40.91	82	111	193	107	27.33
12	1	16	17	5.88	50	213	263	37	16.67
17	3	13	16	18.75	59	168	227	73	19.67
22	1	17	18	5.55	40	231	271	29	13.33
27	2	19	21	9.52	20	223	243	57	6.67
32	2	15	17	11.76	30	259	289	11	10.00
37	9	11	20	45.00	105	169	274	26	35.00
42	8	7	15	53.33	93	159	252	48	31.00
47	9	6	15	60.00	156	82	238	62	52.00
52	6	6	12	50.00	146	120	266	34	48.67
57	6	6	12	50.00	141	59	200	100	47.00
T	67	141	208	398.53	1039	1924	2963	637	346.34
X	5.58	11.75	17.33	33.21	86.58	160.33	246.92	53.08	28.86

Tabela 11. GRUPO DE TRATAMENTO K

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	N ^o	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^o	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
5	20	21	41	48.78	126	102	228	72	42.00
10	7	4	11	63.64	125	138	263	37	41.67
15	6	8	14	42.86	76	179	255	45	25.33
20	8	9	17	47.06	133	113	246	54	44.33
25	9	13	22	40.91	116	133	249	51	38.67
30	9	4	13	69.23	188	66	254	46	62.67
35	33	13	46	71.74	216	72	288	12	72.00
40	9	14	23	39.13	108	157	265	35	36.00
45	10	3	13	76.92	194	59	253	47	64.67
50	7	5	12	58.33	126	108	234	66	42.00
55	7	8	15	46.67	127	139	266	34	42.33
60	11	13	24	45.83	118	142	260	40	39.33
T	136	115	251	651.10	1653	1408	3061	539	551
X	11.33	9.58	20.92	54.26	137.75	117.33	255.08	44.92	45.92

Tabela 12. GRUPO DE TRATAMENTO L

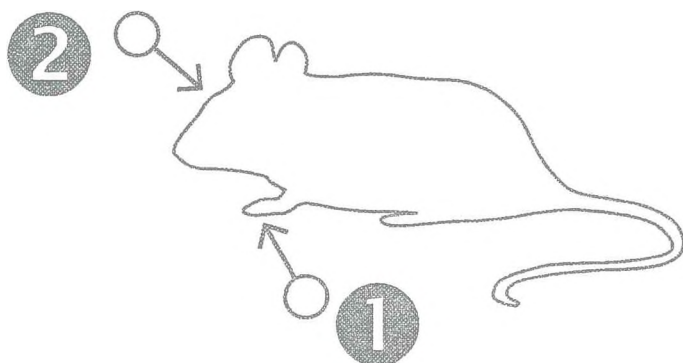
ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	Nº	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% nº	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
9	9	9	18	50.00	118	120	238	62	39.33
13	1	16	17	5.88	25	228	253	47	8.33
15	7	7	14	50.00	90	159	249	51	30.00
17	9	10	19	47.37	132	140	272	28	44.00
19	1	17	18	5.55	30	209	239	61	10.00
21	10	11	21	47.62	126	141	267	33	42.00
23	9	11	20	45.00	120	131	251	49	40.00
25	6	6	12	50.00	127	104	231	69	42.33
27	11	10	21	52.38	158	113	271	29	52.67
29	2	14	16	12.50	34	226	260	40	11.33
T	65	111	176	366.30	960	1571	2531	469	319.99
X	6.50	11.10	17.60	36.63	96.00	157.10	253.10	46.90	32.00

Tabela 13. GRUPO DE TRATAMENTO M

ANIMAL	ENTRADAS				TEMPO DESPENDIDO				
	N ^o	(A)	(F)		TOTAL (A+ F)	% n ^e	t _A (Seg.)	t _F (Seg.)	
10	7	15	22	31.82	84	194	278	22	28.00
12	4	10	14	28.57	74	160	234	66	24.67
14	8	5	13	61.54	160	108	268	32	53.33
16	10	8	18	55.55	117	109	226	74	39.00
18	9	7	16	56.25	111	102	213	87	37.00
20	8	10	18	44.44	112	134	246	54	37.33
22	5	7	22	41.67	111	128	239	61	37.00
24	10	8	18	59.55	168	94	262	38	56.00
26	6	9	15	40.00	117	146	263	37	39.00
28	6	6	12	50.00	108	145	253	47	36.00
T	73	85	158	465.39	1162	1320	2482	518	390.40
X	7.30	8.50	15.80	46.54	116.20	132.00	248.20	51.80	39.04

FIGURAS

Figura 1. Acupontos utilizados e sua localização.



Ponto 7 do meridiano do coração (1) e ponto extra Yintang (2).