Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2016

Alterações comportamentais induzidas por
Pentilenotetrazol e por Alprazolam em animais
submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e
estimulados por campo magnético estático

PPGRDF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL
FMRP-USP

Raquel Cardoso Brito

Tese de Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REABILITAÇÃO E DESEMPENHO
FUNCIONAL

RAQUEL CARDOSO BRITO

**Alterações comportamentais induzidas por Pentilenotetrazol e por Alprazolam
em animais submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e estimulados por
campo magnético estático.**

Ribeirão Preto

2016

Raquel Cardoso Brito

Alterações comportamentais induzidas por Pentilenotetrazol e por Alprazolam em animais submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e estimulados por campo magnético estático.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo junto ao Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Área de concentração: Fisioterapia

Orientador: João Eduardo de Araújo

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Brito, Raquel Cardoso

Alterações comportamentais induzidas por Pentilenotetrazol e por Alprazolam em animais submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e estimulados por campo magnético estático.

114p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Motricidade, Plasticidade Neuromuscular e Neuronal. USP, 2016.

Orientador: Araújo, João Eduardo de

1. Campos magnéticos estáticos, 2. Labirinto em cruz elevado, 3. Pentilenotetrazol, 4. Alprazolam

Nome: Brito, Raquel Cardoso

Título: Alterações comportamentais induzidas por Pentilenotetrazol e por Alprazolam em animais submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e estimulados por campo magnético estático.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese àqueles que são meu motivo: Marcelo, Mariana e Rafael.

Amo e sou grata sempre e para sempre.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Eduardo de Araújo pela oportunidade e conhecimentos oferecidos, minha gratidão e respeito.

Aos meus amores Marcelo, Mariana e Rafael pela compreensão e presença, sou fã e aprendiz de vocês, meu amor incondicional.

À minha família que colaborou imensamente para que eu tivesse uma retaguarda e pudesse concluir este trabalho, meu reconhecimento e gratidão.

À colega e amiga de laboratório Takae, que sempre esteve ao meu lado contribuindo e compartilhando seus conhecimentos, minha admiração e agradecimento.

Agradeço também às colegas de laboratório Tamiris e Thairyne pela parceria e ajudas recebidas, estou nas suas torcidas.

Às alunas de iniciação científica Franciely e Maísa por sua disponibilidade e participação, meu carinho.

Aos meus pacientes, que com paciência e entendimento me facilitaram neste processo, que vocês sejam recompensados, meu amor.

Aos funcionários: Rubinho, que me ajudou a cuidar dos animais deste estudo, tornando possível a coleta de dados, e ao Samuel e à Marília pelo suporte na secretaria, minha gratidão.

Resumo

Brito, R. C. **Alterações comportamentais induzidas por Pentilenotetrazol e por Alprazolam em animais submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e estimulados por campo magnético estático.** 2016. 114f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os campos magnéticos estáticos interferem com o sistema nervoso central lesado, modificando a atividade de diferentes estruturas e recuperando o comportamento afetado pela lesão. Esse trabalho tem por objetivo investigar os efeitos dos polos magnéticos em ratos Wistar saudáveis e as repercussões comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e por Alprazolam (ALP) sob o efeito da estimulação magnética. EXPERIMENTO I - Foram utilizados 107 ratos albinos Wistar, machos, pesando entre 270 – 300g. Após quatro dias da implantação de um magneto (3200 Gauss) no crânio dos animais, esses foram submetidos à avaliação comportamental no LCE. Grupos injetados receberam, via intraperitoneal, 30 mg/kg de PTZ ou salina. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA, as significâncias foram evidenciadas pelo pós-teste de *Holm Sidak* com valor de P significativo $<0,05$. Observamos diminuição no número de entradas nos braços abertos nos grupos PN, PTZ e SMPTZ em relação ao grupo C, e um aumento nas entradas do grupo PSPTZ sobre os grupos PTZ e SMPTZ ($F_{6, 158} = 1,91$). Análise etológica revelou um aumento da apresentação do comportamento espreitar nos grupos PTZ, SMPTZ, PNPTZ, PSPTZ ($F_{6, 79} = 3,51$), diminuição na apresentação dos comportamentos mergulho de cabeça ($F_{6, 79} = 2,40$) e levantamentos ($F_{6, 79} = 17,64$) nos grupos PN, PS, PTZ, SMPTZ, PNPTZ e PSPTZ em relação ao C. EXPERIMENTO II – Participaram 79 animais mantidos nas mesmas condições experimentais que no experimento I, injetados com Alprazolam (1mg/kg – intraperitoneal) ou salina. Observamos um aumento no número de entradas nos braços abertos nos grupos ALP e SMALP em relação ao grupo C ($F_{6, 144} = 3,53$). A porcentagem de entradas nos braços abertos foi maior nos grupos ALP e SMALP em relação ao C ($F_{6, 72} = 2,41$), e a porcentagem de tempo nos braços abertos foi maior no PNALP, comparado com o C ($F_{6, 72} = 3,95$). A análise etológica revelou um aumento na frequência dos comportamentos mergulho de cabeça ($F_{6, 72} =$

10,79) e exploração da extremidade final ($F_{6, 72} = 6,00$) nos grupos ALP, SMALP e PNALP em relação ao C. Para o comportamento de levantamentos ($F_{6, 72} = 4,71$) também observamos um aumento da frequência desse comportamento para os grupos ALP, SMALP e PSALP em relação ao C. No experimento I, o polo Sul conseguiu antagonizar o efeito do PTZ, na variável espaço-temporal entradas nos braços abertos, além disso, a estimulação magnética polo Norte, mimetizou o efeito do PTZ. No experimento II, ambos os polos magnéticos antagonizaram o efeito ALP na variável espaço-temporal entradas nos braços abertos. As variáveis etológicas também revelaram um antagonismo da resposta ALP, pelo polo Norte e pelo polo Sul. Dessa maneira, esse trabalho mostra através da análise comportamental no LCE que os campos magnéticos podem interferir de maneira distinta com as modificações no comportamento de ratos injetados com PTZ ou ALP.

Palavras chave: Campos magnéticos estáticos. Labirinto em cruz elevado. Pentilenotetrazol. Alprazolam.

Abstract

Brito, R. C. **Behavioral changes induced by Pentylentetrazole and Alprazolam in animals in Elevated Plus-Maze and stimulated by static magnetic field.** 2016. 114f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Static magnetic fields interfere with the injured central nervous system, modifying the activity of different structures and recovering the behavior affected by the lesion. The objective of this study was to investigate the effects of magnetic poles on healthy Wistar rats and the behavioral repercussions of the Penzolenotetrazole (PTZ) and Alprazolam (ALP) induction on the Elevated Plus-Maze (EPM) under the effect of magnetic stimulation. EXPERIMENT I - 107 male Wistar rats weighing between 270 and 300 g were used. After four days of implantation of a magneto (3200 Gauss) in the cranium of the animals, they were submitted to behavioral evaluation in the EPM. Injected groups received intraperitoneally 30 mg / kg of PTZ or saline. The data were analyzed by ANOVA, the significance was evidenced by the Holm Sidak post-hoc with a significant P value <0.05. We observed a decrease in the number of entrance open arms in the PN, PTZ and SMPTZ groups compared to group C, and an increase in the PSPTZ group on PTZ and SMPTZ groups ($F_{6, 158} = 1.91$). Ethological analysis showed an increase in the peeking out behavior in the PTZ, SMPTZ, PNPTZ, PSPTZ groups ($F_{6, 79} = 3.51$) and a decrease in the performance of the head dipping behavior ($F_{6, 79} = 2.40$), and of rearing in PS, PTZ, SMPTZ, PNPTZ and PSPTZ in relation to C ($F_{6, 79} = 17.64$). EXPERIMENT II - Participated 79 animals maintained in the same experimental conditions as in experiment I, injected with Alprazolam (1mg / kg - intraperitoneal) or saline. We observed an increase in the number of entrance into open arms in the ALP and SMALP groups compared to group C ($F_{6, 144} = 3.53$). And the percentage of open arms entries was higher in the ALP and SMALP groups than C ($F_{6, 72} = 2.41$), and the percentage of open arms time spent was higher in PNALP, compared to C ($F_{6, 72} = 3.95$). The ethological analysis revealed an increase in the frequency of head dipping behaviors ($F_{6, 72} = 10.79$) and end-arm activity ($F_{6, 72} = 6.00$) in the groups ALP, SMALP and PNALP in relation to C. Already for the rearing ($F_{6, 72} = 4.71$), we also observed an increase in the frequency of this behavior for the ALP, SMALP and PSALP groups in relation to C. In the experiment I, the South pole was able to antagonize the PTZ effect, as reported for the space-time variable in the

open arms, besides the North pole magnetic stimulation, ***mimics*** the PTZ effect. In the experiment II, both magnetic poles antagonize the ALP effect in the space-time variable in the open arms. The ethological variables also revealed an antagonism of the ALP response, by the North and South poles. Thus, this work shows through the behavioral analysis in the EPM that the magnetic fields can interfere in a different way with the modifications in the behavior of injected rats with PTZ or ALP.

Key words: Static magnetic field. Elevated Plus-Maze. Pentylentetrazole. Alprazolam.

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALP – Alprazolam

ANOVA – Análise de variância

Ca²⁺ – Íons de Cálcio

CEM – Campo Eletromagnético

CEMs – Campos Eletromagnéticos

Cl⁻ – Íons de Cloro

CM – Campo Magnético

CME – Campo Magnético Estático

CMEs – Campos Magnéticos Estáticos

CMs – Campos Magnéticos

EPM – Erro Padrão da Média

GABA – Ácido Gama Amino Butírico

GABA-T – GABA Transaminase

GAD – Glutamato Descarboxilase

K⁺ – Íons de Potássio

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

mT – Militesla

Na⁺ – Íons de Sódio

6-OHDA – Neurotoxina 6–hidroxidopamina

ON – Óxido Nítrico

PA – Potencial de ação

PPT – Potenciação Pós-Tetânica

PRA – Período Refratário Absoluto

PTZ – Pentilenotetrazol

SCP – Substância Cinzenta Periaquedutal

SNC – Sistema Nervoso Central

T – Tesla

Lista de Figuras

Figura 1 – Figura ilustrativa da comunicação intercelular, liberação do neurotransmissor GABA pelo neurônio pré-sináptico, seu sítio de ligação no neurônio pós-sináptico, o receptor GABA_A, que tem formação pentamérica, ao redor de um canal de íons de Cl⁻, com sítios de afinidade e ligação para barbitúricos, picrotoxina, GABA, neuroesteróides e Benzodiazepínicos. Quando o GABA se liga ao seu sítio receptor no neurônio pós-sináptico, abre o canal de Cl⁻, de modo que mais Cl⁻ entra na célula e resulta na neurotransmissão inibitória. A figura também apresenta a recaptação e catabolização do GABA. Figura modificada de Tufik (2008)40

Figura 2 – Figura ilustrativa do complexo receptor GABA_A, com os dois ligantes, o GABA e o Benzodiazepínico (BZ), acoplados aos respectivos sítios, o que amplia a abertura do canal de Cl⁻ (✓), em relação à abertura provocada apenas pelo GABA. Os Benzodiazepínicos isoladamente não aumentam o influxo de Cl⁻. Figura modificada de Sthal (2002)42

Figura 3 – Animal após inserção do magneto, acondicionado em caixa individual de polipropileno com grade de inox49

Figura 4 – Rato Wistar com capacete magnético52

Figura 5 – Figura representativa do ímã de neodímio, ferro e boro magnetizado utilizado no grupo estimulado (seta preta) e do ímã não magnetizado utilizado no grupo “sham” (seta branca). Note que, na presença de limalha de ferro, o material magnetizado promove a atração da limalha (seta preta), enquanto que no material não magnetizado não há atração da limalha (seta branca). Fonte: **Efeitos Comportamentais e Neurais Induzidos Pelo Campo Magnético Estático em um Modelo Experimental de Parkinson Induzido Pela Neurotoxina 6-Hidroxidopamina em Ratos Wistar. Dissertação de Mestrado, Bertolino (2013)**52

Figura 6 – Labirinto em Cruz Elevado (visto da lateral)53

Figura 7 – LCE com um rato Wistar, explorando um dos braços abertos durante o protocolo de captação de imagem. Imagem gerada pela filmadora (Sony – DCR-SR21) para avaliação.....55

Figura 8 – Sala de coleta de dados com o Labirinto em Cruz Elevado, vista da sala ao lado.....55

Figura 9 – Figura representativa do total de Entradas nos Braços Abertos e Fechados do LCE. As colunas representam a média de entradas nos braços abertos e fechados. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao grupo C. #significância estatística em relação aos grupos PTZ e SMPTZ ANOVA *Two Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, p<0,05. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1260

Figura 10 – Figura representativa da Porcentagem de Entradas e de Tempo de permanência nos Braços Abertos. As colunas representam a porcentagem de entradas e

tempo de permanência nos braços abertos. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao C. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p<0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1261

Figura 11 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esquadrinhar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação aos demais grupos. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p<0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.....62

Figura 12 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Espreitar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao C, PN e PS. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p<0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1263

Figura 13 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esticar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1264

Figura 14 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Mergulho da Cabeça. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao C. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p<0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1265

Figura 15 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Exploração da Extremidade Final dos Braços Abertos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN=

estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1266

Figura 16 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Imobilidade. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1267

Figura 17 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Levantamentos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao grupo C. #significância estatística em relação aos demais grupos experimentais. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 1268

Figura 18 – Figura representativa da Frequência do total de Entradas nos Braços Abertos e nos Braços Fechados do LCE. As colunas representam a frequência média de entradas nos braços abertos e fechados. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C e PN. ANOVA *Two Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1180

Figura 19 – Figura representativa da porcentagem de Entradas e Tempo nos Braços Abertos do LCE. As colunas representam a frequência média de entradas nos braços abertos e fechados. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1181

Figura 20 - Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esquadrinhar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1182

Figura 21 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Espreitar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1183

Figura 22 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esticar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1184

Figura 23 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Mergulho da Cabeça. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C, PN, OS e PSALP. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1185

Figura 24 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Exploração da Extremidade Final dos Braços Abertos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C, PN, OS e PSALP. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1186

Figura 25 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Imobilidade. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1187

Figura 26 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Levantamentos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C, PN, PS e PNALP. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, no grupo PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 1188

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela dos comportamentos espontâneos de Ratos no LCE, e suas categorias de análise. Modificada de Rodgers e Dalvi (1997b)38

Tabela 2 – Média das porcentagens do número de entradas e do tempo dispendido na exploração dos Braços Abertos (BA)59 e 79

Introdução	28
1.1 Campos Magnéticos.....	29
1.1.1 Campos Magnéticos e Sistemas Biológicos	30
1.1.2 Campos Magnéticos e o Sistema Nervoso Central	31
1.1.3 Campo Magnético X Comportamentos.....	33
1.2 Modelos Animais de Ansiedade	35
1.2.1 Labirinto em Cruz Elevado	36
1.3 Drogas que Modificam a Expressão do Comportamento	39
1.3.1 Pentilenotetrazol.....	39
1.3.2 Alprazolam.....	41
2. Objetivo Geral.....	45
3. EXPERIMENTO I.....	46
3.1 Objetivos Específicos Experimento I.....	47
3.2 Materiais e Métodos	48
3.2.1 Animais.....	49
3.2.2 Grupos e Protocolo de Estimulação	50
3.2.3 Estimulação Magnética.....	51
3.2.4 Avaliação Comportamental.....	53
3.2.5 Delineamento Experimental.....	56
3.2.6 Droga e Dose.....	56
3.2.7 Análise Estatística	57
3.3 Resultados Experimento I	58
3.4 Discussão Experimento I.....	69
4. EXPERIMENTO II.....	73
4.1 Objetivos Específicos Experimento II.....	74
4.2 Materiais e Métodos	75
4.2.1 Animais.....	76
4.2.2 Estimulação Magnética.....	76
4.2.3 Avaliação Comportamental.....	76
4.2.4 Delineamento Experimental.....	76
4.2.5 Droga e Dose	76
4.2.6 Análise Estatística	76

4.3	Resultados Experimento II	78
4.4	Discussão Experimento II.....	89
5.	Discussão Geral	93
	Conclusão	98
	Referências	100

1.1 Campos Magnéticos

O planeta Terra possui um campo magnético estático (CME) natural e constante, que proporciona uma exposição magnética que varia entre 0,03 Militesla (mT) a 0,07mT, dependendo da localização geográfica da medição (KOWALCZUK; SIENKIEWICZ; SAUNDERS, 1991). Campos magnéticos (CMs) que apresentam potência menor do que 1 (um) mT ($< 1 \text{ mT}$) são classificados como fracos, aqueles entre 1 mT e 1 Tesla (T) ($1 \text{ mT} \geq 1 \text{ T}$) são considerados moderados, serão fortes quando a potência está entre 1 T e 5 T ($1 \text{ T} \geq 5 \text{ T}$) e ultra forte, quando a potência é maior do que 5 T ($> 5 \text{ T}$). Os CMs fracos, como o da Terra, possivelmente interferem em funções biológicas e orgânicas, por exemplo, são responsáveis pela capacidade de orientação espacial e navegação em vários sistemas orgânicos (ROSEN, 2003a).

Diferentes sistemas celulares são afetados pelos CMs através da interferência na suscetibilidade das biomoléculas (ALBUQUERQUE et al., 2016), nas modificações estruturais intracelulares (CHIONNA et al., 2003) e nas alterações das reações enzimáticas (WANG et al., 2014). Os efeitos esperados no nível celular são complexos, pois dependem da intensidade, da magnitude do campo, da frequência de exposição e do sistema biológico estimulado (KOCH et al., 2003).

Diferentes trabalhos já revelaram que, os CMs exercem influência sobre diferentes células *in vitro* e em diversos sistemas celulares, entre eles, o sistema ósseo, o tegumentar, o cardiovascular, o pancreático e o neural (ALEXANYAN; KATAEVA; ROMANOV, 2008; BERTOLINO et al., 2006; CHANG et al., 2004; EDWARDS; TALELLI; ROTHWELL 2008; GMITROV; OHKUBO; OKANO, 2002; GMITROV; OHKUBO, 1998; KOBIERSKA et al., 2002). A maioria desses trabalhos, utilizaram como ferramenta de estimulação os campos eletromagnéticos (CEMs), entretanto, recentemente, alguns trabalhos vêm utilizando o CME como fonte de estimulação no tecido neural (BERTOLINO et al., 2013(a); BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b; GIORGETTO et al., 2015; LASZLO et al., 2009).

1.1.1 Campos Magnéticos e Sistemas Biológicos

Os CMs exercem diversas influências sobre os sistemas biológicos. Sua ação depende da estrutura celular e da sensibilidade do sistema em questão (ALBUQUERQUE et al., 2016). Por exemplo, sobre o sistema tegumentar age acelerando a reparação tecidual (BERTOLINO et al., 2006), já no sistema cardiovascular, a estimulação magnética promove alterações na macro e na microcirculação, o que acarreta aumento do fluxo sanguíneo (GMITROV; OHKUBO; OKANO, 2002) e variação da pressão arterial (OKANO, OHKUBO, 2003). Também já foi evidenciada sua ação sobre a membrana celular, incrementando a atividade de células do sistema imunológico (McCREARY et al., 2006), de células ósseas (CHANG et al., 2004; SELVAMURUGAN et al., 2007) e de células nervosas (CUI et al., 2014).

Os tecidos biológicos apresentam um grau de diamagnetismo em alguns componentes inorgânicos, e em todos os componentes orgânicos da membrana celular, que quando expostos aos CMs sofrem modulação e promovem alterações funcionais nos sistemas (ROSEN, 1993; 2003a). A ação dos CMs sobre a membrana celular proporciona a ativação de diversas respostas, nas propriedades biomecânicas e na comunicação intracelular, proporcionando um potencial para a reorganização do citoesqueleto celular (ROSEN, 1994). Esta reorganização foi mostrada em células de câncer de mama, por uma redução da adesão celular e alteração nos seus níveis iônicos (WANG et al., 2014).

Está bem relatado na literatura que os CMs são capazes de atuar em níveis iônicos, modulando o influxo e a concentração intracelular dos íons Cálcio (Ca^{2+}) envolvidos na manutenção da homeostase e nos processos de morte celular por apoptose (FANELLI et al., 1999; KOCH et al., 2003). Ainda, os CMs podem interferir com os canais de Sódio (Na^+) localizados na membrana celular, (ROSEN, 2003a), alterar a função dos canais iônicos (ROSEN, 2003b) e alterar o fluxo transmembrana de Ca^{2+} (FANELLI et al., 1999). O mecanismo dessas interferências está relacionado com a alteração da anisotropia diamagnética, ou seja, através do estímulo dos CMs ocorre uma alteração na direção do movimento intercelular e transmembranar (ROSEN, 2003a).

1.1.2 Campos Magnéticos e o Sistema Nervoso Central

Os CMs atuam modificando funções no sistema nervoso central (SNC), através de interferências com os sistemas de neurotransmissores e neuro hormônios (KOWALCZUK et al., 1991; LAZLO, 2009; REITER, 1993). Ji e cols. (2009), propuseram que os efeitos gerados pela exposição dos CMs, sobre a morfologia e a viabilidade celular, são desencadeados a partir de uma combinação de três fenômenos induzidos: ligação de íon-proteína, modificação nos radicais livres e alterações nas membranas. A ação dos CMs sobre as ligações de íon-proteína facilita a comunicação intercelular e potencializa o transporte da informação (ALBUQUERQUE et al., 2016). A exposição aos CMs afeta os radicais livres prevenindo os efeitos oxidativos, que provocam danos às moléculas do Ácido Desoxirribonucleico (ADN) (MIYAKOSHI, 2005). Já a interferência na membrana celular se dá através da repolarização, o que equilibra a permeabilidade da membrana e potencializa sua suscetibilidade (WANG et al., 2014).

Na literatura, a capacidade dos CMs para interferirem na permeabilidade da membrana celular, e desta forma, facilitar ou impedir a transmissão de informações interneurônios, é discutida em diferentes parâmetros. Têm sido investigadas, suas propriedades biomecânicas (WANG et al., 2014), sua atuação nos canais de íons, Ca^{2+} e Na^+ (ROSEN, 2003 a-b), sua interposição no Potencial Pós Tetânico (PPT) e no Período Refratário Absoluto (PRA) celular (SUN et al., 2016). Tem sido investigada também, a capacidade dos CMs atuarem na orientação de elétrons desemparelhados em íons metálicos, oferecendo energia cinética para a molécula (ALBUQUERQUE et al., 2016; MIYAKOSHI, 2005). No entanto, a interferência na liberação de íons Ca^{2+} , parece ser a hipótese mais adequada e que estaria em consonância com a teoria de modificação da comunicação intercelular (SUN et al, 2016) e possivelmente na origem das demais modificações biológicas descritas na literatura (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Sun e cols. (2016) mostraram que, a exposição a campos eletromagnéticos (CEMs) de baixa intensidade, afeta criticamente a transmissão sináptica e a plasticidade do SNC. Em seu estudo encontraram evidências de que a exposição aos CEMs de baixas frequências durante a exocitose, acelera drasticamente todas as formas de endocitose, e atua na liberação e captação do

conteúdo das vesículas pré-sinápticas, mas não afeta o tamanho do PRA. O PRA indica que um novo potencial de ação (PA), despolarização e repolarização, só pode ser gerado quando a membrana estiver completamente repolarizada, ou seja, quando voltar aos níveis de repouso. Também demonstraram que a exposição a campo eletromagnético (CEM) de baixa intensidade potencializa a transmissão na sinapse por aumento da amplitude do PPT. O PPT é uma forma de plasticidade na comunicação celular de curto prazo. Essas modificações no PA celular, são possíveis devido à expressão aumentada de canais de Ca^{2+} no terminal do nervo pré-sináptico, principalmente nos subtipos P e Q. Essas subunidades dos canais de Ca^{2+} localizam-se nos terminais pré-sinápticos de neurônios e células motoras, e sua principal função é a liberação de neurotransmissores (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Para uma revisão, é importante lembrar que o Ca^{2+} atua como um mensageiro em muitos processos intracelulares, tais como a diferenciação, a proliferação e a regulação da morte celular por apoptose e é estritamente regulado em quase todos os tipos de células (CUI et al., 2014). Estudos mostraram que os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, que se localizam nos terminais pré-sinápticos, podem ser responsáveis pelos efeitos biológicos após a exposição a CEM (ALBUQUERQUE et al., 2016; FANELLI et al., 1999; WANG et al., 2014). Desta forma, o Ca^{2+} pode desencadear a exocitose e dar início as diferentes formas de endocitose. Alterar o equilíbrio dos canais de Ca^{2+} é extremamente relevante para a regulação neuronal, já que, são ativados por forte despolarização e apresentam desativação lenta. Sendo assim, os CMs podem aumentar a sobrevivência das células através da inibição da morte apoptótica, e por isso, podem se transformar em um importante recurso na terapia de doenças que possuam como base a desregulação desse mecanismo (BERTOLINO et. al., 2013a; BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b; FANELLI et al., 1999; GIORGETTO et al., 2015).

Em nosso laboratório, trabalhos recentes (BERTOLINO et al. 2013a; BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b; GIORGETTO et al., 2015) revelaram que os CMEs podem, de fato, apresentar efeitos neuroprotetores, através da inibição apoptótica que se dá devido ao incremento do influxo de Ca^{2+} , além de viabilizar a homeostase comportamental. Além disso, Bertolino e cols. (2013a) mostraram que os CMEs são capazes de exercer um efeito neuroprotetor, reverter as alterações comportamentais e morfológicas produzidas por isquemia encefálica global em

Gerbilos. Em outro trabalho, utilizando um modelo químico, para a produção dos sintomas do Parkinsonismo, mostramos que os CMEs também promoveram efeito neuroprotetor e reverteram as alterações comportamentais e morfológicas após a micro injeção da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), na substância negra compacta de ratos Wistar (BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b).

Os mesmos efeitos observados nos trabalhos anteriores, foram obtidos após lesão estriatal utilizando ácido quinolínico, em um modelo experimental da doença de Huntington. Nesse estudo, os CMEs foram capazes de reverter as alterações de desempenho motor, avaliadas no monitor de atividades após 14 dias no teste de Rota Rod (GIORGETTO et al., 2015) e, resultados semelhantes são observados com 7 (sete) dias (resultados não publicados).

Nesse estudo de Giorgetto e cols. (2015), ambos os polos promoveram preservação neuronal e, do ponto de vista comportamental, respostas distintas nos dois modelos de avaliação comportamental. Possivelmente, a diferente modulação do comportamento se deu pela necessidade de utilização da Apomorfina, para evidenciar os prejuízos comportamentais produzidos pela lesão estriatal. Uma vez que, no monitor de atividades a apomorfina estava biologicamente ativa, e sua ação produzia as rotações contralaterais, o bloqueio desse comportamento produzido pelo polo Norte se deu por uma interação funcional do campo com a droga. Já no Rota Rod, sem a ação da apomorfina, ambos os polos foram efetivos para modular o desempenho comportamental. Assim o polo Norte parece ter interferido com o efeito da droga, gerando a hipótese de que os CMEs poderiam interagir com diferentes moléculas biologicamente ativas e capazes de modificar a expressão comportamental.

1.1.3 Campo Magnético X Comportamentos

Picton em 1966 mostrou que os CMs fracos podem influenciar o comportamento de rotações, durante o voo de moscas de frutas (*Drosophila melanogaster*). Esse comportamento se modificava em relação ao polo magnético presente no modelo, durante a avaliação comportamental. Sendo assim, essa foi

possivelmente uma das primeiras evidências, que correlacionou os campos magnéticos com a expressão de comportamentos espécie específicos.

Após esse trabalho inicial, atualmente os trabalhos mais frequentemente encontrados na literatura utilizam CEMs. Esse tipo de campo não é estático, possui uma frequência conhecida, mas, por outro lado, apresentam a desvantagem da falta de definição polar (CHIONNA et al., 2003; JELENKOVIC et al., 2006; KOWALCZUK et al., 1991; REITER, 1993).

Trabalhos que utilizaram os CEMs revelaram sua potencialidade em modular o comportamento exploratório, a retenção, o aprendizado, o comportamento aversivo e o comportamento ansiolítico através de diversos modelos experimentais (HINCH et al., 2005; GYIRES et al., 2008; LÁZLO, et al., 2009; LEVINE; BLUNI, 1994; SAUNDERS, 2005; WEISS et al. 1992). A exposição aos CEMs, também pode modificar a expressão do comportamento exploratório de ratos no campo aberto, diminuir a capacidade de formar novas memórias, diminuir a aprendizagem, afetando a capacidade de enfrentamento comportamental em um ambiente novo (FOURNIER, et al., 2012)

Apesar do número crescente de estudos sobre os efeitos da interação dos CMs com organismos vivos, lacunas no conhecimento e divergências permanecem, sobre a intensidade, mas especialmente em relação os tipos de campos e os modelos de exposição (FANELLI et al., 1999).

Os efeitos polares dos CMEs no comportamento, devem ser profundamente investigados, uma vez que, parecem interferir de maneira distinta com diferentes sistemas. Por exemplo, na reparação tecidual o polo Norte parece ser mais eficiente do que o polo Sul na primeira semana de exposição (BERTOLINO, et al., 2006). O polo Sul por sua vez, é mais eficiente em preservar neurônios na substância Nigra Compacta de ratos pós-injeção de 6-OHDA (BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b). Ambos os polos, preservam neurônios no hipocampo, estriado e área motora M1 de maneira semelhante, pós-isquemia encefálica global em Gerbilos (BERTOLINO et al., 2013a). E ainda, o polo Norte bloqueia os efeitos da apomorfina em um modelo da doença de Huntington. (GIORGETTO et al., 2015).

1.2 Modelos Animais de Ansiedade

Transtornos de ansiedade em humanos são abordados atualmente como um fenômeno complexo, que envolve diferentes sistemas neuroquímicos, com várias origens etológicas e que podem ser divididos de várias formas: estado e traço de ansiedade, ansiedade normal e patológica, transtornos comportamentais, etc. (GRALLERT; TAVARES; De ARAÚJO, 2003). Os animais não podem modelar todos os aspectos da ansiedade humana, mas estudos com animais permitem investigações profundas dos processos neurobiológicos, que estão atuando como pano de fundo dos estados marcados pelo medo e a aversão, respostas ativas aos estressores do ambiente que caracterizam distúrbios de ansiedade. (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2011; CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009) Assim, diferentes modelos animais podem ser utilizados, de acordo com sua vocação e sensibilidade para determinados comportamentos ansiosos (BOURIN, 2015).

Os modelos experimentais de ansiedade se subdividem em duas categorias: modelos animais de respostas condicionadas e de respostas não-condicionadas (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Os modelos chamados condicionados, são os que preveem algum treinamento dos animais, privação de água ou comida, ou choque elétrico, utilizados como estímulos aversivos. Já os modelos não condicionados, são aqueles que permitem a observação de comportamentos espontâneos, sem experimentação prévia, e por isso, apresentam alto grau de validade etológica (BOURIN et al., 2007; RODGERS; DALVI, 1997). Os aspectos etológicos são identificados para minimizar os efeitos da confusão entre motivação e percepção, fenômenos que recebem influência dos aspectos: emoção, aprendizagem, memória, necessidades básicas (fome/sede) ou mecanismos nociceptivos, assim um perfil comportamental mais amplo é acessado. Testes que permitem uma avaliação etológica, quando comparados com modelos condicionados, parecem ser melhor qualificados para serem análogos da ansiedade humana (BOURIN, 2015).

Nos modelos animais de ansiedade, o animal é exposto a estímulos exteroceptivos ou exógenos e interoceptivos ou endógenos (BOURIN et.al., 2007). Os estímulos exteroceptivos se referem a uma variedade de tratamentos nocivos, como a exposição a situações de conflito ou choques elétricos inescapáveis, já os

interoceptivos são tratamentos com drogas ansiogênicas e ansiolíticas e/ou estimulação de selecionadas áreas cerebrais (JUNG; LAL; GATCH, 2002). Estes estímulos são utilizados baseados na alta validade preditiva que os modelos de ansiedade animal têm alcançado (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013).

1.2.1 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos modelos experimentais mais utilizado na pesquisa pré-clínica para a elucidação dos parâmetros de ansiedade (CAROBREZ, BERTOGLIO, 2005). O modelo apresenta diversas vantagens como, alta validade etológica, economia, rapidez, simplicidade, alta sensibilidade para o estudo de drogas, além de não necessitar de procedimentos ou estímulos prévios, tais como, privação de água ou choque elétrico (BOURIN et al., 2007; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; PELLOW et al., 1985).

O LCE foi validado por Handley e Mithani em 1984 e, se mantém até os dias atuais, como importante ferramenta na área experimental de investigação comportamental e dos transtornos de ansiedade. É um teste amplamente utilizado em trabalhos com doenças neurológicas e psiquiátricas, bem como, para análise comportamental de animais injetados por neuropsicofármacos, tais como os ansiolíticos, os ansiogênicos, os antidepressivos, os neurolépticos e as substâncias de abuso, como o etanol e nicotina (BOURIN et al., 2007; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

O LCE é construído com dois braços abertos, unidos perpendicularmente a dois braços circundados por paredes (braços fechados), estando o aparato elevado em relação ao solo (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; HANDLEY; McBLANE, 1993; RODGERS; COLE, 1994). Esse modelo de análise comportamental está baseado em duas características conflitivas e inatas dos ratos e camundongos: a aversão por espaços abertos e iluminados e a tendência de exploração de novos ambientes (GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011; HANDLEY; McBLANE, 1993; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). A relação medo/novidade provoca um conflito de aproximação/esquiva em relação aos braços abertos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Inicialmente, a premissa associava a

aversão aos braços abertos à altura (PELLOW, 1985), no entanto, posteriormente observou-se que a tigmotaxia é um importante fator para a aversão aos braços abertos no LCE. A tigmotaxia é a tendência inerente aos ratos de se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas, associada a preferência de se manterem próximos a superfícies verticais, que possivelmente pertence a uma categoria de reação ao medo determinado filogeneticamente (CHOLERIS et al., 2001; GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011).

A análise do comportamento espontâneo de exploração do LCE tem contribuído decisivamente para a identificação da neurobiologia da ansiedade. Nos parâmetros convencionais a porcentagem da preferência pelos braços fechados ou abertos, o número de entradas e o tempo gasto em cada um deles é tomado como um índice de ansiedade. Sendo assim, quanto mais intensa é a ansiedade, menor será a porcentagem de entradas e permanência nos braços abertos (HANDLEY; McBLANE, 1993; HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW; FILE, 1986; RODGERS; COLE, 1994). Animais injetados com drogas ansiolíticas tendem a aumentar o comportamento exploratório, permanecendo mais tempo nos braços abertos, indicando que o fator ambiente novo atua como um estímulo ansiogênico (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; KORTE; BOER, 2003). Por outro lado, animais tratados com drogas ansiogênicas tendem a aumentar o tempo nos braços fechados, elevando a frequência do comportamento de esquia (evitação/fuga) (De ARAÚJO et al., 2001; HANDLEY; McBLANE, 1993; HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986).

O procedimento experimental mais utilizado é o descrito por Pellow e cols. (1985), onde o tempo de observação e registro tem a duração de cinco minutos, e a caracterização da entrada ou saída dos braços, é definida pelo critério da colocação das quatro patas em um deles (RODGERS; COLE, 1994).

Alguns estudos, revelaram que a sensibilidade do modelo pode ser aumentada através de uma abordagem que inclui a análise de parâmetros comportamentais etológicos e/ou a análise descritiva minuto a minuto, assim, com o passar do tempo, novas medidas foram incorporadas na avaliação comportamental do modelo (BOURIN, 2015; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; RODGERS et al., 1997a; RODGERS; JOHNSON, 1995; VARGAS; Da CUNHA; ANDREATINI, 2006).

Os comportamentos considerados na avaliação etológica são: esticar, esquadrinhar, levantamento, autolimpeza, mergulho da cabeça, rastejar, exploração da extremidade aberta, espreitar e imobilidade. Estas categorias foram definidas nos estudos com ratos de Anseloni e Brandão (1997) e de Rodgers e Dalvi (1997b) e, em camundongos, por Rodgers e Johnson (1995).

Estudos que utilizam a análise etológica, para entender mais profundamente as modificações comportamentais, se valem de alguns desses comportamentos, pois são conhecidos os agrupamentos possíveis para explicitar o comportamento ansioso no LCE (CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009; De ARAUJO; HUSTON; BRANDÃO, 2001; GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011). Esses comportamentos foram distribuídos em seis categorias: locomoção, ansiedade, avaliação de risco, tomada de decisão, atividade vertical e exploração (Tabela 1) (RODGERS; DALVI, 1997b).

Tabela 1 – Tabela dos comportamentos espontâneos de Ratos no LCE, e suas categorias de análise. Modificada de Rodgers e Dalvi (1997b).

CATEGORIA	COMPORTAMENTO
Ansiedade	Número total de entradas braços abertos; Porcentagem entradas braços abertos; Porcentagem de tempo braços abertos; Porcentagem de tempo braços fechados; Porcentagem na área central; Retorno aos braços fechados.
Locomoção	Total de entradas nos braços; Entradas nos braços fechados; Espreitar.
Avaliação de Risco	Esticar; Farejar.
Tomada de decisão	Retorno aos braços fechados; Autolimpeza; Porcentagem na área central; Porcentagem entradas nos braços fechados.
Atividades verticais	Levantamento; Autolimpeza.
Exploração	Mergulho da cabeça; Esticar.

1.3 Drogas que Modificam a Expressão do Comportamento

Os Modelos Animais, de avaliação do comportamento, têm sido utilizados para a validação de drogas que atuam no SNC, em função da sua interferência nesse sistema, modificando a forma que os animais reagem ao ambiente (RODGERS; DALVI, 1997b). Drogas tipo-ansiogênicas, são usadas em estudos de ativação de aspectos cognitivos e emocionais (GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011), já as drogas tipo-ansiolíticas, vem sendo testadas em relação a aquisição de comportamentos de enfrentamento em situações potencialmente estressoras (SORREGOTTI et al., 2013).

1.3.1 Pentilenotetrazol

O Pentilenotetrazol (PTZ) (α , β -Cyclopentamethylenetetrazole, 1, 5 - Pentamethylenetetrazole, 6, 7, 8, 9-Tetrahydro-5H-tetrazolo[1,5-a] azepine, Metrazole) é um fármaco que possui forte ação estimulante no SNC. No passado, sua indicação era como analéptico, para estimular o centro respiratório vagal e o centro vasomotor do cérebro, antagonizando os efeitos depressores endógenos e incrementando o fluxo sanguíneo cerebral (KLIETHERMES; FINN; CRABBE, 2003). Também foi descrito e utilizado como droga convulsivante, comumente utilizada em modelos experimentais crônicos e agudos de epilepsia (AGARWAL et al., 2011; VILLALPANDO-VARGAS, MEDINA-CEJA, 2016).

É um agente farmacológico considerado antagonista não competitivo do Ácido Gama Aminobutírico (GABA), um dos principais neurotransmissores com ação inibitória do SNC, cuja primeira função é regular a excitabilidade neuronal.

O GABA é um inibidor pré-sináptico de grande importância que realiza sua função inibitória do SNC, através da ativação de receptores resultando em hiperpolarização, pela ativação dos canais de Cl^- (KORPI et al., 2002). Ele é formado pela descarboxilação do L-glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SNC, através da enzima glutamato-decarboxilase (GAD) e catabolizado pela GABA-transaminase (GABA-T), por transaminação em semialdeído succínico (HOELLER et al. 2003; NEMEROFF, 2003) (Figura 1).

Figura 1 – Figura ilustrativa da comunicação intercelular, liberação do neurotransmissor GABA pelo neurônio pré-sináptico, seu sítio de ligação no neurônio pós-sináptico, o receptor GABA_A, que tem formação pentamérica, ao redor de um canal de íons de Cl⁻, com sítios de afinidade e ligação para barbitúricos, picrotoxina, GABA, neuroesteróides e Benzodiazepínicos. Quando o GABA se liga ao seu sítio receptor no neurônio pós-sináptico, abre o canal de Cl⁻, de modo que mais Cl⁻ entra na célula e resulta na neurotransmissão inibitória. A figura também apresenta a recaptação e catabolização do GABA. Figura modificada de Tufik (2008).

Esse neurotransmissor cumpre seus efeitos mais estudados por sua ligação a três receptores divididos em duas classes: os ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) e o metabotrópico (GABA_B). O GABA_A e o GABA_C são encontrados nos canais iônicos de Cloro (Cl⁻) e atuam aumentando a condutância de Cl⁻ nos neurônios pré-sinápticos. Já o GABA_B, exerce sua função via proteína-G intracelular, aumentando a condutância de canais de Ca²⁺ e de potássio (K⁺) (GRALLERT; TAVARES; De ARAÚJO, 2003). Embora não existam indícios da participação dos receptores GABA_B e GABA_C, o receptor GABA_A está intimamente relacionado aos transtornos de ansiedade (NEMEROFF, 2003).

O GABA_A é uma glicoproteína transmembrana hetero-oligomérica composta de cinco subunidades, codificadas por 16 a 19 genes diferentes das seguintes famílias: α, β, γ, δ, ε, θ e ρ (KORPI et.al., 2002). Estas estão dispostas ao redor de um canal central, em forma pentamérica, seletivamente permeável a íons

de Cl^- , com sítios de afinidade e ligação para diversas drogas como: barbitúricos, anestésicos gerais, neuroesteróides e beta-carbolinas.

Para que a inibição neural GABAérgica ocorra, é necessário um influxo aumentado dos íons de Cl^- tornando a membrana hiperpolarizada (NEMEROFF, 2003). O PTZ atua como antagonista do receptor GABA_A , agindo na expressão do canal de Cl^- , ao diminuir a condutância nesses canais, inviabiliza o aumento do influxo de Cl^- . O PTZ também interfere na função da bomba de Na^+ e K^+ , pela diminuição da condutância desses íons associada ao aumento do influxo de Ca^{2+} (HANSEN; SPERLING; SÁNCHEZ, 2004)

As vias GABAérgicas estão distribuídas por todo o SNC, por isso todos os sistemas de neurotransmissão, incluindo os mediadores ansiogênicos, têm seus efeitos modulados pela neurotransmissão GABA. As estruturas cerebrais implicadas na mediação do medo e da ansiedade possuem importantes redes neurais GABAérgicas, a saber a substância cinzenta periaquedutal (PAG), a amígdala e o hipocampo (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2011; HOELLER, 2013; MILLAN, 2003).

Além dos seus efeitos convulsivantes, ao se testar doses subconvulsivantes de PTZ, foram descritos diversos efeitos como aumento da ansiedade, que se torna intensa, e ataques de pânico (CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009). Na pesquisa experimental, sua utilização clássica é como uma droga convulsivante, porém se consolidou em modelos experimentais de ansiedade, como um protótipo de droga ansiogênica. Os estímulos endógenos desencadeados pelo PTZ são similares, do ponto de vista fisiológico e comportamental, aos da ansiedade, já que, ao bloquear a ação do GABA, produz alta atividade locomotora (JUNG; LAL; GATCH, 2002; PELLOW et al., 1985).

1.3.2 Alprazolam

O Alprazolam (ALP) (AS8-cloro-1-metil-6-fenil-4H triazolo benzodiazepina) é uma droga que apresenta ação inibitória no SNC, potencializando a neurotransmissão GABAérgica, através da potencialização da atividade dos

receptores GABA, especificamente o GABA_A (CHHALOTIYA, et al., 2015). O ALP ao se ligar ao receptor GABA_A, através da subunidade alfa (α), sítio das benzodiazepinas, provoca uma excitação da atividade desse receptor, tornando-o mais sensível à ação do neurotransmissor GABA, potenciando o seu efeito fisiológico. Isso caracteriza o ALP como um benzodiazepínico de ação agonista, esta relação ligante receptor promove a abertura dos canais de Cl⁻, aumentando seu influxo para o interior da célula neuronal e, como consequência, a hiperpolarização do neurônio. Com isso, a transmissão de novos potenciais de ação é dificultada, exercendo um efeito depressor do SNC (GRALLET et al., 2003).

Dessa forma, benzodiazepínicos potencializam seletivamente o sistema GABAérgico, atuando sobre os receptores GABA_A, que constitui o maior sistema de inibição neuronal do SNC e, com isso, elevam a amplitude das ações do GABA (MILLAN, 2003; SPENCE; GUERIN; GOEDERS, 2016). Seus principais efeitos são atuar na mediação do sono, influenciar no relaxamento muscular, na atividade anticonvulsivante (CHHALOTIYA et al., 2015). Já nos modelos experimentais, o ALP vem sendo utilizado por seu perfil ansiolítico, sem desconsiderar suas outras propriedades: sedativas, hipnóticas, anticonvulsivantes e de relaxamento muscular, além de atuar na coordenação motora e na memória (ANDREATINI et al., 2001) (Figura 2).

Figura 2 – Figura ilustrativa do complexo receptor GABA_A, com os dois ligantes, o GABA e o Benzodiazepínico (BZ), acoplados aos respectivos sítios, o que amplia a abertura do canal de Cl⁻ (✓), em relação à abertura provocada apenas pelo GABA. Os Benzodiazepínicos isoladamente não aumentam o influxo de Cl⁻. Figura modificada de Sthal (2002).

Uma vez que o ALP e PTZ modificam a expressão comportamental (ansiolítica ou ansiogênica) de ratos, e esse tipo de modificação pode ser detectada pelo LCE, nosso trabalho se propõe a investigar se o CME, polo Norte e polo Sul, pode interferir com a modificação do comportamento induzido pela injeção dessas duas drogas em ratos Wistar.

Objetivos

2. Objetivo Geral

Analisar a possível interação funcional dos CMEs, polo Norte e polo Sul, sobre a resposta comportamental induzida pela droga Ansiogênica PTZ e pela droga Ansiolítica ALP em ratos Wistar no LCE.

3. *EXPERIMENTO I*

**Alterações comportamentais induzidas pelo Pentilenotetrazol e estimulação
por campo magnético estático em ratos submetidos ao Labirinto em Cruz
Elevado**

3.1 Objetivos Específicos Experimento I

- Verificar os efeitos da exposição dos CMEs, polo Norte e Sul, sobre a resposta ansiogênica provocada pelo PTZ nos parâmetros espaço-temporais de exploração do LCE.
- Verificar os efeitos da exposição dos CMEs, polo Norte e Sul, sobre a resposta ansiogênica provocada pelo PTZ nas categorias comportamentais etológicas observadas na exploração do LCE.

3.2 *Materiais e Métodos*

3.2.1 Animais

Foram utilizados 107 ratos albinos Wistar, machos, pesando entre 270 – 300 gramas, divididos nove grupos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo – USP, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e alojados no biotério do laboratório experimental do prédio da Fisioterapia, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP - USP). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa e Experimentação Animal da Universidade de São Paulo (USP) sob o protocolo número 090/2014.

Após a chegada ao biotério da fisioterapia, os ratos ficaram acondicionados em grupos de seis animais por caixa, por quatro dias antes da inserção do capacete magnético, para adaptação ao ambiente experimental. As caixas foram forradas com serragem, a temperatura foi controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), foram expostos ao ciclo claro escuro de 12 horas e alimentados com ração e água *ad libitum* (à vontade), durante todo experimento. Depois do procedimento cirúrgico para implantação do magneto, foram alocados individualmente em caixas de polipropileno com grade de inox, para não haver atração com o magneto, até a avaliação comportamental (Figura 3).

Figura 3 – Animal após inserção do magneto, acondicionado em caixa individual de polipropileno com grade de inox.

3.2.2 Grupos e Protocolo de Estimulação

Os grupos experimentais foram compostos ao longo da coleta de dados randomicamente, chegando à distribuição abaixo.

I. Grupo Controle (C): Animais sem nenhum tipo de manipulação experimental, tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a habituação no biotério (n= 13).

II. Grupo Controle + Salina (S): Animais submetidos à injeção intraperitoneal de salina (1 ml/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a habituação no biotério (n= 12).

III. Grupo Sham Magnético + Salina (SMS): Animais com falsa estimulação magnética, submetidos à injeção intraperitoneal de salina (1 ml/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do falso magneto (n= 12).

IV. Grupo Estimulado Polo Norte (PN): Animais com estimulação magnética polo Norte, tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do estímulo (n= 11).

V. Grupo Estimulado Polo Sul (PS): Animais com estimulação magnética polo Sul, tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do estímulo (n= 11).

VI. Grupo Pentilenotetrazol (PTZ): Animais submetidos à injeção intraperitoneal de PTZ (30mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a habituação no biotério (n= 16).

VII. Grupo Sham Magnético + Pentilenotetrazol (SMPTZ): Animais com falsa estimulação magnética, submetidos à injeção intraperitoneal de PTZ (30mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do falso magneto (n= 10).

VIII. Grupo Estimulado Polo Norte + Pentilenotetrazol (PNPTZ): Animais com estimulação magnética polo Norte, submetidos à injeção intraperitoneal de PTZ (30mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do estímulo (n= 11).

IX. Grupo Estimulado Polo Sul + Pentilenotetrazol (PSPTZ): Animais com estimulação magnética polo Sul, submetidos à injeção intraperitoneal de PTZ (30mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do estímulo (n= 11).

3.2.3 Estimulação Magnética

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Tribromoetanol – Sigma-Aldrich, USA (250 mg/kg). Quando a perda total dos reflexos foi observada, foram posicionados na tábua cirúrgica em decúbito ventral, e foi realizada a tricotomia na parte superior da cabeça do animal. Na área do escalpo, foi feita assepsia com álcool iodado, e injetada uma solução de Lidocaína – Cristália, Brasil, a 2% por via subcutânea, com o objetivo de formar uma pápula, que além dos efeitos anestésico local e vasoconstritor, também orientou a remoção do escalpo do topo do crânio do animal. O tecido subcutâneo foi removido e em seguida o periósteo, deixando a calota craniana exposta permitindo a visualização da sutura lambdoide e da coronária. O crânio estava posicionado de forma que o bregma e o lambda ficassem em um mesmo plano horizontal, e nesta área um magneto circular foi colado, e posteriormente coberto por uma camada de acrílico auto-polimerizável, que depois de endurecer além de ocluir a incisão, conteve o magneto. Ao final do procedimento os animais receberam uma injeção intramuscular de 120.000 U.I. de penicilina G benzatina (Fontoura-Wyeth-Brasil). Em seguida, o animal permaneceu na sua caixa, até o momento de ser exposto ao LCE, nas condições descritas no tópico animais, neste capítulo (Figura 4).

Figura 4 – Rato Wistar com capacete magnético.

Para realizar a estimulação magnética, foram utilizados magnetos circulares de Neodímio, Ferro e Boro ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$), com dimensões de 8 mm x 3 mm e intensidade magnética de 3200 Gauss (0,32 Tesla) (Global Mag, São Paulo, Brasil). Os magnetos dos grupos Sham Magnético foram constituídos pelo mesmo material, apresentavam as mesmas especificações de tamanho, porém não foram magnetizados (Figura 5).

Figura 5 – Figura representativa do ímã de neodímio, ferro e boro magnetizado utilizado no grupo estimulado (seta preta) e do ímã não magnetizado utilizado no grupo “sham” (seta branca). Note que, na presença de limalha de ferro, o material magnetizado promove a atração da limalha (seta preta), enquanto que no material não magnetizado não há atração da limalha (seta branca). Fonte: **Efeitos Comportamentais e Neurais Induzidos Pelo Campo Magnético Estático em um Modelo Experimental de Parkinson Induzido Pela Neurotoxina 6-Hidroxidopamina em Ratos Wistar. Dissertação de Mestrado, Bertolino (2013).**

3.2.4 Avaliação Comportamental

Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) utilizado nesse trabalho é um equipamento elevado a 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50x10cm), dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais desprovidas de teto (50x10x40cm), formando um ângulo de 90° entre os braços (Figura 6). Nos braços abertos foram colocadas lâminas acrílicas de 1 cm de altura, com o objetivo de evitar a queda dos animais. Os animais foram colocados no centro do labirinto no início de cada sessão, voltados para os braços abertos.

O equipamento foi colocado em uma sala iluminada artificialmente por uma luz branca (40W, 120lux). Uma câmera de vídeo (Sony – DCR-SR21) registrou as imagens durante o experimento, transmitindo-as para um notebook (Asus, tela 15 polegadas). Um monitor tela plana (LG, 20 polegadas) foi instalado na sala ao lado para que o experimentador pudesse acompanhar a coleta de dados sem interferir com o desempenho comportamental dos ratos (Figura 7).

Figura 6 – Labirinto em Cruz Elevado (visto da lateral).

O desempenho dos animais no LCE foi medido através dos parâmetros espaço temporais: número de entradas nos braços abertos e fechados, e porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto pelo animal nesses braços. Uma entrada num dos braços foi considerada quando o animal colocou as quatro patas neste braço.

Também foram utilizadas para descrever o comportamento dos animais as seguintes categorias comportamentais etológicas: **esquadrinhar** (projeção da cabeça, perscrutando os lados, em qualquer direção), **levantamento** (comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras, apoiado ou não nas paredes do labirinto), **mergulho da cabeça** (movimentos exploratórios de cabeça/ombro nas laterais dos braços abertos em direção ao chão), **esticar** (postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), **exploração da extremidade aberta** (mergulho da cabeça nas extremidades dos braços abertos), **espreitar** (projeção da cabeça/ombro dos braços fechados para o centro do labirinto, sendo que as quatro patas permanecem no braço fechado) e **imobilidade** (animal parado, sem nenhum tipo de movimento por mais de 6 segundos) (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; De ARAUJO et al., 1999; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Figura 7 – LCE com um rato Wistar, explorando um dos braços abertos durante o protocolo de captação de imagem. Imagem gerada pela filmadora (Sony – DCR-SR21) para avaliação.

Figura 8 – Sala de coleta de dados com o LCE, vista da sala ao lado.

3.2.5 Delineamento Experimental

Todas as etapas do presente experimento foram executadas no período da manhã. Todos os animais ficaram alojados durante oito dias antes da avaliação comportamental, sendo quatro de habituação ao biotério, mais quatro dias em que os ratos dos grupos estimulação magnética foram tratados antes de serem avaliados no LCE.

Todos os animais foram submetidos à análise de dados comportamentais e em seguida sofreram eutanásia, por dose anestésica excessiva de Tribromoetanol. Trinta minutos antes de serem levados ao LCE, os animais dos grupos injetados, foram conduzidos a uma sala ao lado da sala de experimentos, para serem injetados com PTZ ou Salina. Quando expostos ao LCE, os animais tiveram seu comportamento espontâneo registrado em vídeo por 5 minutos. Todos os animais foram colocados na porção central do LCE, de frente para um dos braços abertos. O aparato foi limpo com álcool diluído em 30%, e seco com papel toalha, entre as avaliações.

Todos os vídeos foram gravados e analisados separadamente por dois examinadores cegos, que verificaram manualmente a frequência de cada um dos animais para as variáveis espaço temporais e etológicas, em um computador (LENOVO) com monitor tela plana de 16 polegadas (LG).

3.2.6 Droga e Dose

A droga utilizada neste experimento foi o Pentilenotetrazol (PentylenetetrazoleR, Sigma, USA) (PTZ), em uma dose de 30 mg/kg, diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9% - Salina). Essa dose foi escolhida por já ter sido testada em trabalhos anteriores, se mostrando eficiente na modificação do comportamento de ratos Wistar no LCE (SORREGOTTI et al., 2012). Além disso, já é conhecido que doses mais elevadas de PTZ causam efeito convulsivante (AGARWAL, et. al., 2011; KALUEFF et al., 2007b). Os grupos controles receberam solução fisiológica (NaCl 0,9% / Salina). Tanto o PTZ quanto a Salina foram

injetados por via intraperitoneal, em um volume de 1 ml/kg. (CARVALHO-NETTO; NUNES DE SOUZA, 2004; RODGERS; JOHNSON, 1995).

3.2.7 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com o programa *SigmaPro* versão 11.0. Os dados obtidos foram representados como média + erro padrão da média (EPM). As variáveis, porcentagem de tempo, entradas nos braços abertos e as variáveis etológicas foram submetidas a uma análise de variância de uma via (ANOVA *One Way*). Já as variáveis número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, foram submetidas a uma análise de variância de duas vias (ANOVA *Two Way*). Quando os valores obtidos de F alcançaram significância estatística, as diferenças entre os grupos foram detectadas através do pós-teste de *Holm Sidak*. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

3.3 *Resultados Experimento I*

Os resultados comportamentais, obtidos dos três grupos controles (C, S e SMS), não revelaram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre eles para as medidas convencionais total de entradas nos braços abertos e fechados ($F_{2, 68} = 1,40$; $p = 0,25$), porcentagem de entradas ($F_{2, 34} = 3,17$; $p = 0,06$) e tempo ($F_{2, 34} = 1,08$; $p = 0,34$) nos braços abertos. Também não existem diferenças para as variáveis etológicas esquadrinhar ($F_{2, 34} = 0,28$; $p = 0,75$), espreitar ($F_{2, 34} = 0,55$; $p = 0,57$), esticar ($F_{2, 34} = 1,95$; $p = 0,15$), mergulho da cabeça ($F_{2, 34} = 0,91$; $p = 0,40$), exploração da extremidade aberta ($F_{2, 34} = 1,23$; $p = 0,30$), imobilidade ($F_{2, 34} = 0,13$; $p = 0,87$) e levantamentos ($F_{2, 34} = 2,16$; $p = 0,13$). Dessa maneira, para simplificar e facilitar a análise e entendimento dos resultados, utilizaremos o grupo C para as próximas comparações (Tabela 2).

Tabela 2 – Média das porcentagens do número de entradas e do tempo dispendido na exploração dos Braços Abertos (BA).

Grupos	Média % Entradas BA	EPM % Entradas BA	Média % Tempo BA	EPM % Tempo BA
C	40,11	2,56	21,82	4,72
S	36,25	3,20	20,08	2,80
SMS	30,91	1,88	14,30	3,29

A análise das medidas convencionais no LCE revelaram uma diminuição estatisticamente significativa para o número de entradas nos braços abertos nos grupos PN, PTZ e SMPTZ em relação ao grupo C, e um aumento nas entradas do grupo PSPTZ sobre os grupos PTZ e SMPTZ ($F_{6, 158} = 1,91$; $p < 0,05$). Em relação ao número de entradas nos braços fechados não existem diferenças significativa entre os grupos ($F_{6, 158} = 0,91$; $p = 0,485$) (Figura 9). Já a porcentagem de entradas nos braços abertos revelou um menor número de entradas no grupo PTZ em relação ao C ($F_{6, 79} = 2,29$; $p < 0,05$) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos não revelou diferenças entre os grupos ($F_{6, 79} = 1,18$; $p = 0,32$) (Figura 10).

Figura 9 – Figura representativa do total de Entradas nos Braços Abertos e Fechados do LCE. As colunas representam a média de entradas nos braços abertos e fechados. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao grupo C. #significância estatística em relação aos grupos PTZ e SMPTZ ANOVA *Two Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

Figura 10 – Figura representativa da Porcentagem de Entradas e de Tempo de permanência nos Braços Abertos. As colunas representam a porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao C. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica esquadrinhar, revelou uma diminuição estatisticamente significativa desse comportamento no grupo PN em relação aos demais grupos ($F_{6,79} = 2,64$; $P < 0,05$) (Figura 11).

Figura 11 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esquadrinhar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação aos demais grupos. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Espreitar, revelou um aumento na frequência de apresentação desse comportamento nos grupos PTZ, SMPZ, PNPTZ e PSPTZ em relação aos grupos C, PN e PS. Ainda, o grupo PSPTZ apresentou um aumento desse comportamento ($F_{6,79} = 3,51$; $P < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Espreitar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. * significância estatística em relação ao C, PN e PS. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Esticar, não revelou nenhuma modificação estatisticamente significativa da apresentação desse comportamento entre os grupos ($F_{6, 79} = 0,72$; $p = 0,64$) (Figura 13).

Figura 13 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esticar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Mergulho da Cabeça, revelou uma diminuição da frequência de apresentação desse comportamento em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo C ($F_{6,79} = 2,40$; $P < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Mergulho da Cabeça. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao C. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Exploração da Extremidade Final dos braços abertos, não revelou nenhuma significância estatística entre os grupos analisados ($F_{6,79} = 0,53$; $P = 0,77$) (Figura 15).

Figura 15 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Exploração da Extremidade Final dos Braços Abertos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Imobilidade, não revelou nenhuma significância estatística entre os grupos analisados ($F_{6, 79} = 1,68$; $P = 0,13$) (Figura 16).

Figura 16 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Imobilidade. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= sham magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Levantamentos, revelou uma diminuição da frequência de apresentação desse comportamento em todos os grupos quando comparados com o C. Ainda, o grupo PSPTZ apresenta a menor expressão desse comportamento quando comparado com os demais grupos experimentais ($F_{6, 79} = 17,64$; $P < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Levantamentos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, PTZ= pentilenotetrazol, SMPTZ= *sham* magnético + pentilenotetrazol, PNPTZ= polo Norte + pentilenotetrazol e PSPTZ= polo Sul + pentilenotetrazol. *significância estatística em relação ao grupo C. #significância estatística em relação aos demais grupos experimentais. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais nos grupos C e PNPTZ foi igual a 13, nos grupos PN e PS foi igual a 11, no grupo PTZ foi igual a 16, no SMPTZ foi igual a 10 e no grupo PSPTZ foi igual a 12.

3.4 *Discussão Experimento I*

Ratos Wistar expostos ao LCE apresentam uma forte preferência pela exploração dos braços fechados e uma reação de esquiva em relação aos braços abertos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; KORTE; BOER, 2003). Dessa forma, o comportamento do tipo ansiogênico foi definido, nesse modelo, quando os animais apresentam uma diminuição no número de entradas nos braços abertos (BOURIN et al., 2007; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; RODGERS; COLE, 1994). Em nosso trabalho, com a dose ansiogênica clássica de 30mg/kg de PTZ, os animais apresentaram o comportamento descrito em relação à exploração dos braços abertos. Assim, tanto a dose quanto o LCE, utilizados nesse trabalho, estão validados pela similaridade de ativação comportamental revelada por outros trabalhos na literatura (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; ZORZETO FILHO, 2001; BOURIN, 2015; SORREGOTTI et al., 2013). O que chama atenção, é que a estimulação magnética polo Norte também produziu uma resposta comportamental semelhante à observada com o PTZ. Além disso, o polo magnético Sul produziu uma clara interferência na ativação do perfil ansiogênico revelado por um aumento nessa variável comportamental clássica.

O PTZ é também uma droga conhecida pelos seus efeitos convulsivantes (AGARWAL et al., 2011; KALUEFF et al., 2007b; SILVA et al., 2011). Esses efeitos do PTZ podem ser inibidos por injeções sistêmicas de Ng-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor não seletivo do óxido nítrico (NO). No entanto, esta mesma droga, assim como outros inibidores do NO, não foram capazes de inibir o efeito tipo-ansiogênico do PTZ em ratos submetidos ao LCE (UZBAY; LAL, 2002). Até mesmo a microinjeção de L-NAME na coluna dorso lateral da substância cinzenta periaquedutal (SCP) de ratos não reverteu o efeito tipo-ansiogênico do PTZ no LCE (VARGAS; CUNHA; ANDREATINI, 2006). Já que a inibição dos efeitos ansiogênicos do PTZ não foi demonstrada nos trabalhos acima, de maneira sistêmica ou na SCP, nossos dados são inovadores e instigantes, sugerindo uma interferência produzida pelo polo magnético Sul na ação do PTZ no encéfalo de ratos Wistar, revertendo essa medida clássica de ansiedade.

Alguns comportamentos etológicos avaliados em nosso trabalho se modificaram pela ação do PTZ e podem nos mostrar que a ação dos campos

magnéticos vai além da modificação do comportamento ansioso induzido pelo PTZ. Foram eles, o espreitar, o mergulho de cabeça e os levantamentos.

O comportamento de Espreitar está classificado na categoria comportamental de tomada de decisão e também de locomoção. Quando o espreitar aumenta, os níveis de ansiedade também estão elevados (RODGERS; DALVI, 1997), além de indicar que não existiu prejuízo locomotor em nossos animais. Esse fato também foi evidenciado pela não alteração do número de entradas nos braços fechados (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; KORTE; BOER, 2003). Ainda assim, o comportamento de mergulho de cabeça e levantamentos se apresentaram reduzidos em nossos grupos experimentais. Tanto os animais tratados com os diferentes polos magnéticos, tratados com PTZ e com PTZ mais estimulação magnética. Assim como o mergulho de cabeça, os levantamentos também estão na categoria comportamental de atividades exploratórias (CRUSIO, 2001; HOFFMANN; THORÉN; ELY, 1987). A redução do comportamento mergulho de cabeça induzido pelo PTZ está de acordo com o trabalho de Sorregotti e cols. (2013).

O PTZ é uma droga que atua se ligando aos receptores GABA_A, diminuindo assim o potencial de ação do GABA e, dessa maneira, diminuindo a inibição da comunicação neuronal em diferentes sistemas (HOELLER et al., 2013; NEMEROFF, 2003). As atividades exploratórias, como o mergulho de cabeça e os levantamentos são dramaticamente dependentes de estruturas como o córtex motor e a área CA1 do Hipocampo (SHIMIZU et al., 2007; THIEL et al., 1999; WINTER et al., 2004). Uma vez que os receptores GABA_A estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória (KALUEFF, 2007a; JELENKOVIC et al., 2006), e que a redução da atividade GABAérgica pode potencializar os processos mnemônicos e facilitar o aprendizado (JELENKOVIC et al., 2006), e ainda desencadear o medo diante do risco (CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009), podemos entender a redução desses dois comportamentos etológicos descritos acima (HOELLER et al., 2013; RIBEIRO et al., 1999). Vale a pena propor que, os polos magnéticos Norte e Sul podem atuar modificando o ambiente intercelular, com alterações na anisotropia diamagnética, o que modifica a direção do movimento iônico transmembranar (ROSEN, 2003a), nos mesmos sítios onde o PTZ está atuando.

Já que o mecanismo de ação farmacológica do PTZ é via sistema GABAérgico, seria possível então que os campos magnéticos estejam modificando o comportamento, através desse sistema de neurotransmissão. Fica uma questão para ser investigada posteriormente, se esta interferência é maior na ativação ou dispersão do neurotransmissor GABA, ou se ocorre sistemicamente. Além disso, as mais diferentes ações do PTZ são dose dependente (AMIRIA et al., 2016; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993), assim como, os campos magnéticos chegam a diferentes estruturas encefálicas com potências distintas (BERTOLINO et al., 2013a; BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b). Sendo assim, o balanço entre a ativação de comportamentos semelhantes ao PTZ, pelos campos Norte e Sul, e a inibição do efeito PTZ pode ter ocorrido de maneira distinta, nas mais diferentes estruturas encefálicas que medeiam o comportamento de ratos no LCE.

Dessa maneira, confirmamos a hipótese inicial de que o CME pode interferir com a ação do PTZ, no comportamento de ratos submetidos ao LCE, e ainda, as polaridades magnéticas Norte e Sul parecem produzir respostas semelhantes ao PTZ em alguns comportamentos etológicos. Assim, em nosso experimento I, o polo Sul parece ter a capacidade de interferir com os mecanismos ansiogênicos do PTZ.

4. EXPERIMENTO II

**Alterações comportamentais induzidas pelo Alprazolam e
estimulação por campo magnético estático em ratos submetidos ao Labirinto
em Cruz Elevado**

4.1 Objetivos Específicos Experimento II

- Verificar os efeitos da exposição dos CMEs, polo Norte e Sul, sobre a resposta ansiolítica provocada pelo Alprazolam nos parâmetros espaço-temporais de exploração do LCE.

- Verificar os efeitos da exposição dos CMEs, polo Norte e Sul, sobre a resposta ansiolítica provocada pelo Alprazolam nas categorias comportamentais etológicas observadas na exploração do LCE.

4.2 *Materiais e Métodos*

ANIMAIS, ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA, AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estes tópicos estão descritos no Experimento I. No presente estudo, foram utilizados 44 ratos Wistar machos, em adição aos animais já descritos no experimento I.

I. **Grupo Alprazolam (ALP):** Animais submetidos à injeção intraperitoneal de Alprazolam (1mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a habituação no biotério (n= 11).

II. **Grupo Sham Magnético + Alprazolam (SMALP):** Animais com falsa estimulação magnética, submetidos à injeção intraperitoneal de Alprazolam (1mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do falso magneto (n= 11).

III. **Grupo Estimulado Polo Norte + Alprazolam (PNALP):** Animais com estimulação magnética polo Norte, submetidos à injeção intraperitoneal de Alprazolam (1mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do estímulo (n= 11).

IV. **Grupo Estimulado Polo Sul + Alprazolam (PSALP):** Animais com estimulação magnética polo Sul, submetidos à injeção intraperitoneal de Alprazolam (1mg/kg), tendo seu comportamento avaliado no LCE no quarto dia após a inserção do estímulo (n= 11).

4.2.5 Droga e Dose

A droga utilizada foi o Alprazolam (Frontal – Pfizer, USA), numa dose de 1mg/kg, diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9% / Salina), contendo 2% de *Tween* 80. Essa dose foi apontada em trabalhos anteriores como capaz de promover

mudanças comportamentais no modelo de ansiedade animal no LCE (SORREGOTTI et al., 2012). O Alprazolam foi injetado por via intraperitoneal, em um volume de 1ml/kg (CARVALHO-NETTO; NUNES DE SOUZA, 2004; SPENCE, 2016).

4.3 *Resultados Experimento II*

Os resultados comportamentais, obtidos dos três grupos controles (C, S e SMS), não revelaram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre eles para as medidas convencionais total de entradas nos braços abertos e fechados ($F_{2, 68} = 1,40$; $p = 0,25$), porcentagem de entradas ($F_{2, 34} = 3,17$; $p = 0,06$) e tempo ($F_{2, 34} = 1,08$; $p = 0,34$) nos braços abertos. Também não existem diferenças para as variáveis etológicas esquadrinhar ($F_{2, 34} = 0,28$; $p = 0,75$), espreitar ($F_{2, 34} = 0,55$; $p = 0,57$), esticar ($F_{2, 34} = 1,95$; $p = 0,15$), mergulho da cabeça ($F_{2, 34} = 0,91$; $p = 0,40$), exploração da extremidade aberta ($F_{2, 34} = 1,23$; $p = 0,30$), imobilidade ($F_{2, 34} = 0,13$; $p = 0,87$) e levantamentos ($F_{2, 34} = 2,16$; $p = 0,13$). Dessa maneira, para simplificar e facilitar a análise e entendimento dos resultados, utilizaremos o grupo C para as próximas comparações (Tabela 2).

Tabela 2 – Média das porcentagens do número de entradas e do tempo dispendido na exploração dos Braços Abertos (BA)

Grupos	Média % Entradas BA	EPM % Entradas BA	Média % Tempo BA	EPM % Tempo BA
C	40,11	2,56	21,82	4,72
S	36,25	3,20	20,08	2,80
SMS	30,91	1,88	14,30	3,29

A análise das medidas convencionais no LCE revelou um aumento estatisticamente significativo para o número de entradas nos braços abertos nos grupos ALP e SMALP em relação ao grupo C e PN ($F_{6, 144} = 3,53$; $p < 0,05$). Em relação ao número de entradas nos braços fechados não existem diferenças significativa entre os grupos ($F_{6, 144} = 1,32$; $p = 0,24$) (Figura 18). Já a porcentagem de entradas nos braços abertos revelou um maior número de entradas no grupo ALP e SMALP em relação ao C ($F_{6, 72} = 2,41$; $p < 0,05$) e a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos um maior tempo do PNALP em relação ao grupo C ($F_{6, 72} = 3,95$; $p < 0,05$) (Figura 19).

Figura 18 – Figura representativa da Frequência do total de Entradas nos Braços Abertos e nos Braços Fechados do LCE. As colunas representam a frequência média de entradas nos braços abertos e fechados. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C e PN. ANOVA *Two Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

Figura 19 – Figura representativa da porcentagem de Entradas e Tempo nos Braços Abertos do LCE. As colunas representam a frequência média de entradas nos braços abertos e fechados. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Esquadrinhar, não revelou nenhuma modificação na apresentação desse comportamento em nenhum dos grupos analisados ($F_{6, 72} = 1,51$; $P = 0,19$) (Figura 20).

Figura 20 - Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esquadrinhar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Espreitar, não revelou nenhuma modificação na apresentação desse comportamento em nenhum dos grupos analisados ($F_{6,72} = 2,21$; $P = 0,06$) (Figura 21).

Figura 21 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Espreitar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Esticar, não revelou nenhuma modificação na apresentação desse comportamento em nenhum dos grupos analisados ($F_{6,72} = 1,12$; $P = 0,35$) (Figura 22).

Figura 22 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Esticar. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Mergulho da Cabeça, revelou um aumento na frequência de apresentação desse comportamento nos grupos ALP, SMALP e PNALP em relação aos grupos C, PN, PS e PSALP ($F_{6,72} = 10,79$; $P < 0,05$) (Figura 23).

Figura 23 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Mergulho da Cabeça. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C, PN, OS e PSALP. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Exploração da Extremidade Final dos Braços Abertos, revelou um aumento na frequência de apresentação desse comportamento nos grupos ALP, SMALP e PNALP em relação aos grupos C, PN, PS e PSALP ($F_{6, 72} = 6,00$; $P < 0,05$) (Figura 24).

Figura 24 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Exploração da Extremidade Final dos Braços Abertos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C, PN, OS e PSALP. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Imobilidade, não revelou nenhuma modificação na apresentação desse comportamento em nenhum dos grupos analisados ($F_{6,72} = 1,65$; $P = 0,14$) (Figura 25).

Figura 25 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Imobilidade. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. O número de animais no grupo C foi igual a 13, nos grupos PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

A análise dos dados da variável comportamental etológica Levantamentos, revelou um aumento na frequência de apresentação desse comportamento nos grupos ALP, SMALP e PSALP em relação aos grupos C, PN, PS e PSALP ($F_{6,72}=4,71$; $P<0,05$) (Figura 26).

Figura 26 – Figura representativa da frequência de apresentação do comportamento de Levantamentos. As colunas representam a frequência média do comportamento. As barras representam + o EPM. C= controle, PN= estimulação polo Norte, PS= estimulação polo Sul, ALP= alprazolam, SMALP= sham magnético + alprazolam, PNALP= polo Norte + alprazolam e PSALP= polo Sul + alprazolam. *significância estatística em relação ao grupo C, PN, PS e PNALP. ANOVA *One Way* seguida pelo pós-teste de *Holm Sidack*, $p < 0,05$. O número de animais no grupo C foi igual a 13, no grupo PN, PS, ALP, SMALP, PNALP e PSALP foi igual a 11.

4.4 *Discussão Experimento II*

O LCE se constitui em um ambiente com dois níveis de aversividade, maior nos braços abertos e, menor nos braços fechados. Sendo assim, espera-se que uma droga ansiolítica, como o ALP, aumente a exploração da área de maior aversividade (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; HANDLEY; MITHANI, 1984). Mais uma vez, o LCE utilizado nesse trabalho se mostra adequado, bem como a eficácia da dose de 1mg/kg de ALP. Essa constatação ganha suporte pelas variáveis clássicas analisadas no LCE, que revelaram o aumento no número de entradas nos braços abertos e na porcentagem de entradas nos braços abertos. Assim, o comportamento de exploração nos braços com o maior nível de aversividade do LCE, revela um comportamento menos ansioso após estimulação com o ALP (SORREGOTTI et al., 2013).

A ação do ALP, sobre essas variáveis espaço-temporais do LCE, corrobora com os estudos clássicos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; RODGERS; DALVI, 1997) que validaram esse modelo comportamental. Mais uma vez, em nosso trabalho, a interação droga e campo magnético chama a atenção. Ambos os polos magnéticos parecem interferir com a ação do ALP bloqueando a manifestação comportamental ansiolítica. Essa interferência na ativação por ALP foi produzida por ambos os polos magnéticos. Entretanto, a estimulação magnética realizada com o polo Norte, aumentou a porcentagem de tempo desses animais nos braços abertos. Um maior tempo de permanência, não necessariamente se relaciona a potencialização do efeito ansiolítico, já que o número de entradas nesse braço foi reduzido nos mesmos animais. As reduções do conflito novo/aversivo, induzidas pelo ALP, são seguramente observadas no LCE (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Em nosso trabalho, a interação dos polos magnéticos Norte e Sul com o ALP fez com que os animais desse grupo se comportassem de maneira semelhante aos animais controle, normalizando a resposta comportamental nesses animais.

Em nosso trabalho o ALP, bem como a estimulação magnética isolada ou somada ao ALP, não parece produzir efeitos de inibição ou exacerbação na motricidade dos animais, já que não existe interferência no número de entradas nos braços fechados (PELLOW et al., 1985).

O perfil comportamental observado pelas medidas clássicas do LCE, em nosso trabalho, mais uma vez, é corroborado pela análise dos comportamentos etológicos.

Na literatura o ALP é considerado também uma droga anticonflito (JUNG; LAL; GATCH, 2012; VARGAS; Da CUNHA; ANDREATINI, 2006), sendo assim um aumento do comportamento exploratório, como observamos em nosso trabalho, manifestado por um maior número de levantamentos e mergulho de cabeça, revelam esse perfil comportamental (RODGERS; DALVI, 1997). Além disso, a maior exploração da extremidade final dos braços abertos é um claro índice de diminuição de ansiedade (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; De ARAUJO et al., 1999).

O ALP atua nos sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A, que regula o canal Cl⁻, se ligando às subunidades que não são o local de ligação do GABA, deixando as que são (subunidades α) livres para facilitar a ação inibitória do GABA na transmissão neuronal. Com o influxo de Cl⁻ aumentado, ocorre a hiperpolarização da membrana do neurônio, isso facilita a comunicação intercelular, aumentando o potencial de ação (PA) das vias inibitórias GABAérgicas, que se sabe afetam as funções cognitivas, em especial a memória espacial (COSQUER et al., 2005; SERAFIM et al., 2012). Assim, o aumento da atividade de exploração dos braços abertos e da frequência de variáveis etológicas que ocorrem neste ambiente, como o mergulho de cabeça e a exploração das extremidades dos braços abertos, comportamentos que observamos em nosso trabalho, são claramente entendidos.

Nos comportamentos etológicos analisados, o mergulho de cabeça e a exploração da extremidade final, mais uma vez observamos a interferência do polo magnético Sul. A expressão desses comportamentos, exacerbados pelo ALP, é normalizada pelo campo magnético Sul. A única exceção a esse perfil de modificação comportamental encontrada está relacionada ao comportamento de levantamentos. Nesse caso, quem normaliza a frequência de apresentação deste comportamento é o polo magnético Norte, e não o Sul. Esse comportamento, na categoria de atividade exploratória vertical é um comportamento complexo, já que além da exploração, o animal necessita se apoiar apenas nas patas traseiras (De ARAUJO et al., 2012). Acreditamos que a complexidade na manifestação do comportamento, e pela característica da estimulação magnética ser bastante

abrangente, possa gerar esse tipo de resposta quando diferentes sistemas são estimulados por drogas distintas. Ainda, a inibição da resposta gerada por ALP pelo polo Norte, pode ser emparelhada ao maior tempo de permanência nos braços abertos produzido por esse mesmo polo magnético, uma vez que a expressão dos levantamentos acontece mais propriamente nos braços fechados do LCE. Assim, talvez não estejamos visualizando a interferência no mecanismo de ativação mediado pelo ALP e sim uma impossibilidade de apresentação do comportamento pela limitação do modelo.

Dessa maneira, confirmamos a hipótese inicial de que os CMEs podem interferir com a ação do ALP, no comportamento de ratos submetidos ao LCE, com diferentes resultados para as polaridades Norte e Sul. Em nosso presente trabalho, o polo Sul parece ter a capacidade de interferir com os mecanismos do ALP em relação à expressão comportamental etológica, enquanto que ambos os polos podem modificar a variável clássica entradas nos braços abertos do LCE.

5. *Discussão Geral*

Iniciamos esse trabalho, guiados por uma expectativa gerada em um trabalho anterior do nosso laboratório, que os CMEs poderiam interferir com drogas que modificam a resposta do SNC. Essa hipótese surgiu quando o polo magnético Norte, bloqueou as rotações produzidas por apomorfina em ratos com lesão química no estriado (GIORGETTO et al., 2015). Sendo assim, esse dois experimentos foram desenhados para testar essa hipótese.

Outro ponto importante é que pela primeira vez trabalhamos com animais saudáveis. Os trabalhos anteriores foram realizados com modelos animais de lesões (BERTOLINO et al., 2006; BERTOLINO et al. 2013a; BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b; GIORGETTO et al., 2015). Dessa maneira, pela primeira vez, observamos os efeitos dos polos magnéticos em um encéfalo sem lesão.

Para cumprir esse propósito, buscamos um modelo clássico de avaliação comportamental, o LCE, bem como duas drogas bastante testadas e com efeitos comportamentais conhecidos nesse modelo (JUNG; LAL; GATCH, 2002; SORREGOTTI et al., 2013). O comportamento espontâneo avaliado por este modelo produz respostas comportamentais de ansiedade na exploração de um ambiente novo, o que estimula o conflito gerado pelas características curiosidade/medo de roedores (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009; KORTE; BOER, 2003; PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994; VARGAS; Da CUNHA; ANDREATINI, 2006).

Em nosso trabalho, tanto o PTZ (AGARWAL et al., 2011; CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009), como o ALP (SORREGOTTI et al., 2013) modificaram o comportamento na direção esperada e na linha dos trabalhos clássicos, com essas drogas e modelo.

Podemos apontar dois trabalhos na literatura, que também investigaram a resposta comportamental de ratos no LCE sob estimulação magnética. No trabalho de Cosquer e cols. (2005), foi utilizado um estímulo com baixa frequência eletromagnética (2,45 GHz), sem alterações comportamentais nas variáveis clássicas do LCE. Já Lászlo e cols.(2009), utilizaram para a estimulação um CME presente na caixa de permanência dos animais no biotério. Neste trabalho, nenhuma

alteração comportamental foi observada no LCE. Diferente desses dois trabalhos, em nosso trabalho, observamos modificações comportamentais produzidas pelos polos Norte e Sul. O polo Norte diminuiu o número de entradas nos braços abertos, e os comportamentos etológicos esquadrinhar, mergulho de cabeça e levantamentos. O polo Sul, por sua vez, também reduziu a apresentação do mergulho de cabeça e os levantamentos. Sendo assim, não podemos apontar diferenças importantes em relação às modificações produzidas pelos polos Norte ou Sul, mas podemos apontar para um claro efeito de modificação comportamental. Qual seria então o motivo da obtenção de resultados em nosso experimento em contraste com os trabalhos citados anteriormente? Em nosso trabalho, utilizamos uma estimulação magnética diretamente no crânio do animal, assim, temos um melhor direcionamento e possivelmente uma maior potência magnética, do que nos trabalhos citados anteriormente, além do tempo de exposição maior do que nos dois estudos.

Magnetos possuem potência aferida em sua base, e ao se afastar o gaussímetro da base desse magneto, a potência magnética se reduz drasticamente. No trabalho de Bertolino e cols. (2006), a metodologia de estimulação foi bastante semelhante à utilizada por László e cols. (2009), e os autores mostraram efeitos polares positivos para a cicatrização de feridas no dorso de ratos Wistar. Nesse trabalho, o magneto que apresentava potência magnética de 1600 G, na base da caixa onde os ratos permaneciam, tinha sua potência atenuada para valores abaixo de 50 G a 7 centímetros acima da base da caixa. Ainda, no trabalho de Bertolino e cols. (2013a), a potência de 3200 G no topo do crânio do animal se reduzia para 1500 G no córtex motor e área CA1 do hipocampo e para 670 G no estriado. Assim, a estimulação magnética no trabalho de László e cols. (2009), pode ter sido inadequada para modificar o comportamento de ratos no LCE. Ainda, o campo magnético pulsado, do trabalho de Cosquer e cols. (2005), não apresenta definições polares, que possivelmente é um critério importante para modificar a atividade de estruturas presentes no encéfalo de ratos.

No presente trabalho, utilizamos a análise das variáveis clássicas e também das variáveis etológicas descritas no LCE (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013). As variáveis etológicas são comportamentos mais naturais e podem ter sua expressão visualizada no meio ambiente natural do animal (RÉUS et al., 2014).

Observamos que, nem todas as variáveis etológicas se modificaram, mesmo somente sob o efeito da droga. Algumas mais discretas podem ter sido mal interpretadas pelos avaliadores, outras podem ter sofrido influência do próprio aparato. Entretanto, o perfil de ativação comportamental dessas variáveis nos permitiu entender um pouco mais da interação dos CMEs com as drogas utilizadas. De uma maneira geral, os polos magnéticos Norte e Sul, modificam o efeito droga induzido. O polo magnético Sul antagonizou o efeito PTZ quando observamos o total de entradas nos braços abertos. Na mesma direção, o polo Sul e o Norte, reverteram esse comportamento induzido por ALP. O polo Sul, ainda, antagonizou o efeito ALP nos comportamentos de mergulho de cabeça e exploração da extremidade final dos braços abertos.

Quando analisamos as respostas de diferentes comportamentos, na realidade estamos observando a atividade de diferentes sistemas. Por exemplo, o Espreitar está ligado à categoria locomoção (RODGERS; DALVI, 1997), o comportamento de esquiva/medo é analisado pela diminuição da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), os levantamentos e o mergulho de cabeça a atividade exploratória (CRUSIO, 2001; FRASE et al., 2010). Assim, diferentes estruturas cerebrais estão sendo ativadas e possivelmente moduladas, de maneiras distintas pelas diferentes potências magnéticas que as atingem.

Como o ALP tem potencial para aumentar a ação GABAérgica, ou seja inibir o SNC (RODGERS; DALVI, 1997) e o PTZ atua se ligando aos receptores GABA_A, diminuindo assim o potencial de ação do GABA (HOELLER et al., 2013; NEMEROFF, 2003), poderíamos propor que o polo Sul interagiu tanto com a molécula do PTZ como com a do ALP.

Tornando a análise um pouco mais complicada, o que nos faz ter mais cautela com a proposta acima, é que ambos os polos antagonizaram o efeito ALP no total de entradas nos braços abertos. O polo Norte isoladamente, sem o efeito droga induzido, também já havia reduzido a exploração desses braços. Assim, não podemos propor um mecanismo simples de interação polo magnético e droga ansiolítica e ansiogênica.

Na literatura, a capacidade dos CMs de intervirem na permeabilidade da membrana da célula, e desta forma, facilitar ou impedir a transmissão de informação interneurônios é discutida com diferentes parâmetros. Têm sido investigadas: suas propriedades biomecânicas (WANG et al., 2014), sua atuação nos canais de íons, Ca^{2+} e Na^{+} (ROSEN, 2003 a-b), sua interposição na PPT e no PRA (SUN et al., 2016). Tem sido investigada também a capacidade dos CMs de atuarem na orientação de elétrons desemparelhados em íons metálicos, dando energia cinética para a molécula e transferindo energia, intensificando o rendimento dos radicais elétricos (MIYAKOSHI, 2005).

Um recente trabalho, publicado por Sun e cols., 2016, mostrou que a ação dos CEM modifica os potenciais de ação pré-sinápticos, interferindo na liberação dos conteúdos das vesículas sinápticas. Quanto maior o influxo de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico maior a liberação de neurotransmissores (FANELLI et al., 1999), assim nossa hipótese é que a ação do CME, que modificou a ação das drogas utilizadas, se deu pela modulação dos canais iônicos, interferindo com a modulação do sistema GABAérgico em diferentes estruturas, hora viabilizando, hora impedindo a liberação desse neurotransmissor .

Nossos resultados mostram o possível potencial terapêutico dos CMEs para a modulação comportamental. No entanto, é fundamental a continuidade e o surgimento de mais estudos, uma vez que há ausência de consenso sobre as diferentes ações polares, intensidade e forma de estimulação. Análises neuroquímicas, que utilizem o modelo agonista – antagonista através da microinjeção em estruturas específicas, podem nos ajudar a entender os sítios e as moléculas que estão sendo ativadas ou inibidas pelos CMEs

Até o presente, é possível sugerir que existe um mecanismo de interação/modificação, dos efeitos comportamentais desencadeados pelo PTZ e pelo ALP, que pode ser regulado pelos CMEs, nas condições de intensidade e tempo de estimulação utilizadas neste trabalho. Dessa maneira, confirmamos a hipótese inicial, por variáveis comportamentais, de que o CME pode interferir na ação de drogas, tanto ansiogênicas quanto ansiolíticas, e promover alterações comportamentais em ratos submetidos ao LCE.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam a existência de uma interação funcional dos CMEs, polo Norte e polo Sul, sobre a resposta comportamental induzida pela droga Ansiogênica PTZ e pela droga Ansiolítica ALP em ratos Wistar no LCE.

A polaridade magnética Sul apresentou uma interferência na ação ansiogênica do PTZ, no encéfalo de ratos Wistar, revertendo suas respostas nas medidas espaço-temporais de ansiedade, no LCE.

Ambas as polaridades magnéticas, Norte e Sul, produziram respostas semelhantes ao PTZ nas variáveis etológicas associadas à ansiedade e à exploração do ambiente.

Os dois polos, Norte e Sul, diminuíram as frequências médias das variáveis clássicas do LCE, quando em interação com o ALP, demonstrando respostas comportamentais mais próximas do grupo controle, sem a ativação do SNC produzida pelo ALP.

Já o polo Sul pareceu apresentar a capacidade de interferir com os mecanismos do ALP em relação à expressão comportamental etológica, diminuindo a apresentação de comportamentos com perfil ansiolítico.

Referências

ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Single Units in the Medial Prefrontal Cortex with Anxiety-Related Firing Patterns Are Preferentially Influenced by Ventral Hippocampal Activity. **Neuron**, v. 71, p. 898–910, 2011.

AGARWAL, N. B.; AGARWAL, N. K.; MEDIRATTA, P. K.; SHARMA, K. K.. Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ- kindled mice. **Seizure**, v. 20, p. 257–262, 2011.

ALBUQUERQUE, W. C.; COSTA, R. P. B.; FERNANDES, T. S.; PORTO, A. L. F. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 121, p. 26–28, 2016.

ALEXANYAN, Z. A.; KATAEVA, G. V.; ROMANOV, S. P. Effect of transcranial magnetic stimulation on the emotional state of patient after stroke. **International Journal of Psychophysiology**, v. 69, p. 242–275, 2008.

AMIRIA, S.; HAJ-MIRZAIANA, A.; AMINI-KHOEIA, H.; MOMENYC, M.; SHIRZADIANA, A.; BALAEID, M. R.; ZARRINRAD, G.; GHAZI-KHANSARIA, M.; AZIZIA, R.; DEHPOURA, A. R.; MEHR, S. E. NMDA receptor antagonists attenuate the proconvulsant effect of juvenile social isolation in male mice. **Brain Research Bulletin**, v. 121, p. 158–168, 2016.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23(4), p. 233-42, 2001.

ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioral Pharmacology**, v.8, p. 533–557, 1997.

BERTOLINO, G.; BRAGA, A. F.; ROSA, K. O. L. C.; BRITO JUNIOR, L. C.; DE ARAUJO, J. E. Macroscopic and histological effects of magnetic field exposition in

the process of tissue reparation in Wistar rats. ***Archives Dermatological Research***, v. 298, p. 121–126, 2006.

BERTOLINO, G.; BUIATTI, F. L. A.; DE SOUZA, H, C, D.; COIMBRA, N. C.; DE ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments after bilateral global ischemia surgery and exposure to static magnetic field: evidence in the motor cortex, the hippocampal CA1 region and the neostriatum. ***International Journal of Radiation Biology***, v. 1, p. 1-19, 2013a.

BERTOLINO, G.; DE SOUZA, H, C, D.; DE ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments in Wistar rats with a 6-OHDA lesion in the substantia nigra compact and exposure to a static magnetic field. ***Electromagnetic Biology and Medicine***, v. 32(4), p. 527–535, 2013b.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. ***Neuroscience Biobehavior Reviews***, v. 25, p. 205-218, 2001.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. ***Dialogues in Clinical Neuroscience***, v. 17(3), p. 295–303, 2015.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIERE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. ***Fundamental & Clinical Pharmacology***, v. 21, p. 567–574, 2007.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDOSSIO, J. E.; De ARAUJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. ***Neuroscience Biobehavior Reviews***, v. 23 (6), p. 863-75, 1999.

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

CARVALHO-NETTO, E. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. I. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. ***Behavioral Brain Research***, v. 148, p. 119–132, 2004.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Pentylenetetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. ***Neurobiology of Learning and Memory***, v. 92, p. 512–518, 2009.

CHANG, W. H. S.; CHEN, L. T.; SUN, J. S.; LIN, F. H. Effect of pulse-burrs electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. ***Bioelectromagnetics***, v. 25, p. 457-465, 2004.

CHHALOTIYA, W. K. Thin-layer chromatography method for the simultaneous quantification and stability testing of alprazolam and mebeverine in their combined pharmaceutical dosage form. ***Journal of Taibah University for Science***, 2015. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.012>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

CHIONNA, A.; DWIKAT, M.; PANZARINI E.; TENUZZO, B.; CARLÀ, E. C.; VERRI, T.; PAGLIARA, P.; ABBRO L.; DINI, L. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. ***European Journal of Histochemistry***, v. 47 (4), p. 299–308, 2003.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. ***Neuroscience and Biobehavioral Reviews***, v. 25, p. 235-260, 2001.

CORDA, M. G.; ORLANDI, M.; LECCA, D.; GIORGI, O. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. ***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***, v. 262 (2), p. 792-800, 1992.

COSQUER, B.; GALANI, R.; KUSTER, N.; CASSEL, J-C. Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. ***Behavioural Brain Research***, v. 156, p. 65–74, 2005.

CRUSIO, W. E. Genetic dissection of mouse exploratory behavior. ***Behavioural Brain Research***, v.125, p. 127-132, 2001.

CRUZ, A. P. M.; PINHEIRO, G.; ALVES, S. H.; FERREIRA, G.; MENDES, M.; FARIA, L.; MACEDO, C. E.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. ***Psychopharmacology***, v. 182 (3), p. 345-354, 2005.

CUI Y.; LIU X.; YANG T.; MEI, Y. A.; HU, C. Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields inhibits T-type calcium channels via AA/LTE4 signaling pathway. ***Cell Calcium***, v. 55, p. 48–58, 2014.

De ARAUJO, F. L.; BERTOLINO, G.; GONÇALVES, R. B.; MARINI, L. COIMBRA, N. C.; De ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments after three types of global ischemia surgery in Meriones unguiculatus: evidence in motor cortex, hippocampal CA1 region and the neostriatum. ***Journal of the Neurological-Sciences***, v. 312(1-2), p. 73-8, 2012.

De ARAUJO, J. E.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. ***European Journal of Pharmacology***, v. 432, p. 43-51, 2001.

De ARAUJO, J. E.; SILVA, R. C. B.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. . Anxiogenic effects of substance P and its 7 11 C terminal, but not the 1 7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray? ***Peptides (New York)***, v. 20, p. 1437-1443, 1999.

DUBREUIL D.; JAY T.; EDELINE, J. M. Head-only exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields does not alter rat's memory in spatial and non-spatial tasks. ***Behavioural Brain Research***; v. 145 (1/2), p. 51–61, 2003.

EDWARDS, M. J.; TALELLI, P.; ROTHWELL, J. C. Clinical applications of transcranial magnetic stimulation in patients with movement disorders. ***The Lancet Neurology***, v. 7, p. 827-840, 2008.

FANELLI, C.; COPPOLA, S.; BARONE, R.; COLUCCI, C.; GUALALDI, G.; VOLPE, P.; GHIBELLI, L. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca⁺⁺ influx. ***The FASEB Journal***, v. 13, p. 95–102, 1999.

FOURNIER, N. M.; MACH, Q. H.; WHISSELL, P. D.; PERSINGER, M. A. Neurodevelopmental anomalies of the hippocampus in rats exposed to weak intensity complex magnetic fields throughout gestation. ***International Journal of Developmental Neuroscience***, v. 30, p. 427-33, 2012.

GARCIA, A. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. *The effects of pentylenetetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination.* ***Behavioural Brain Research***, v. 217, p. 171-177, 2011.

GIORGETTO, C.; SILVA, M. C. E.; KITABATAKE, T. T.; BERTOLINO, G.; De ARAUJO, J. E. Behavioural profile of Wistar rats with unilateral striatal lesion by quinolinic acid (animal model of Huntington disease) post-injection of apomorphine and exposure to static magnetic field. ***Experimental Brain Research***, v. 233, p. 1455–1462, 2015.

GMITROV J.; OHKUBO C.; OKANO H. Effect of 0.25 T static magnetic field on microcirculation in rabbits. ***Bioelectromagnetics***, v. 23, p. 224–229, 2002.

GMITROV, J.; OHKUBO, C. Static magnetic field effect on baroreflex sensitivity in rabbits. ***Bioelectromagnetics***, v. 17, p. 217-228, 1998.

GRALLERT, S. M.; TAVARES, L. C.; De ARAÚJO, E. B. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39 (3), p. 243-257, 2003.

GYIRES, C.; ZADORI, Z. S.; RACZ, B.; LASZLO, J. Pharmacological Analysis of Inhomogeneous Static Magnetic Field-Induced Antinociceptive Action in the Mouse. **Bioelectromagnetics**, v. 29, p. 456-462, 2008.

HANDLEY, S.L.; McBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety-modulating drugs. **Journal of Pharmacology Toxicology**, v. 29, p. 129-138, 1993.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327 (1), p. 1-5, 1984.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsivant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, p. 105-113, 2004.

HINCH, R.; LINDSAY, K. A.; NOBLE, D.; ROSENBERG, J. R. The effects of static magnetic field on action potential propagation and excitation recovery in nerve. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 87, p. 321-328, 2005.

HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; DUARTE, F.S.; LEME, L.R.; COSTA, A.A.R.; SANTOS, E.C.S.; PIERIA, C.H.; SANTOS, A.A.; NAIME, A.A.; FARINA, M.; LIMA, T.C.M. GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. **Brain Research**, v. 1532, p. 21-31, 2013.

HOFFMANN, P.; THORÉN, P.; ELY, D. Effect of voluntary exercise on open-field behavior and on aggression in the spontaneously hypertensive rat (SHR). ***Behavioral and Neural Biology***, v. 47, p. 346-55, 1987.

JELENKOVIC, A.; JANAC, B.; PESIC, V.; JOVANOVIĆ, D. M.; VASILJEVIĆ, I.; PROLIĆ, Z. Effects of extremely low-frequency magnetic field in the brain of rats. ***Brain Research Bulletin***, v. 68, p. 355–360, 2006.

JI, W.; HUANG, H.; DENG, A.; PAN, C. Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. ***Micron***, v. 40, p. 894-898, 2009.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentilenotetrazol as a model of anxiety: recent developments. ***Neuroscience and Biobehavioral Reviews***, v. 26, p. 429–39, 2002.

KALUEFF, A. V. Neurobiology of Memory an Anxiety: from genes to behavior. ***Neural Plasticity***, v. 78, p. 171-183, 2007a.

KALUEFF, A. V.; KEISALA, T.; MINASYAN, A.; TUOHIMAA, P. Pharmacological modulation of anxiety-related behaviors in the murine Suok test. ***Brain Research Bulletin***, v. 74, p. 45–50, 2007b.

KLIETHERMES, C. L.; FINN, D. A.; CRABBE, J. C. Validation of a modified mirrored chamber sensitive to anxiolytics and anxiogenics in mice. ***Psychopharmacology***, v. 169, p. 190–197, 2003.

KOBIERSKA, A. L.; CIESLAR, G.; SIERON, A.; GRZYBEK, H. Influence of alternating extremely low frequency ELF magnetic field on structure and function of pancreas in rats. ***Bioelectromagnetics***, v. 23, p. 49-58, 2002.

KOCH, C. L. M. B.; SOMMARIN, M.; PERSSON, B. R. R.; SALFORD, L. G.; EBERHARDT, J. L. Interaction between weak low frequency magnetic fields *Bioelectromagnetics*, v. 24, p. 395-402, 2003.

KORPI, E. R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABA_A and receptors. *Progress Neurobiology*, v. 67, p. 113-159, 2002.

KORTE, S. M.; BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear potentiated behavior in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, v. 463 (1-3), p. 163-75, 2003.

KOWALCZUK, C. I.; SIENKIEWICZ, Z. J.; SAUNDERS, R. D. Biological Effects of Exposure to Non-Ionising Electromagnetic Fields and Radiation. *Static Electric and Magnetic Fields*, v. 45 (1), p. 62-66, 1991.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 68, p. 175-183, 2013.

LAI H.; CARINO, M. A.; HORITA, A.; GUY, A. W. Single vs. repeated microwave exposure: effects on benzodiazepine receptors in the brain of the rat. *Bioelectromagnetics*, v. 13(1), p. 57-66, 1992.

LÁSZLÓ, J.; TÍMÁR, J.; GYARMATI, Z.; FÜRST, Z.; GYIRES, K. Pain-inhibiting inhomogeneous static magnetic field fails to influence locomotor activity and anxiety behavior in mice: No interference between magnetic field- and morphine-treatment. *Brain Research Bulletin*, v. 79, p. 316-321, 2009.

LEVINE, R. L.; BLUNI, T. D. Magnetic Field Effects on Spatial Discrimination Learning in Mice. *Physiology & Behavior*, v. 55 (3), p. 465-467, 1994.

LISTER, R. The use of Plus-Maze to measure anxiety in the mouse. ***Psychopharmacology***, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOGHMANNIA, J.; HEIDAR, B.; ROZATI, S. A.; KAZEMI, S. The physiological responses of the Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry to the static magnetic fields with different intensities during acute and subacute exposures. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 111, p. 215–219, 2015.

McCREARY, C. R.; DIXON, S. J.; FRAHER, L. J.; CARSON, J. J.; PRATO, F. S. Real-time measurement of cytosolic free calcium concentration in Jurkat cells during ELF magnetic field exposure and evaluation of the role of cell cycle. ***Bioelectromagnetics***, v. 27, p. 354–364, 2006.

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

MIYAKOSHI, J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. ***Progress in Biophysics and Molecular Biology***, v. 87, p. 213–223, 2005.

NEMEROFF, C. B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. ***Psychopharmacology Bulletin***, v. 37 (4), p. 133-146, 2003.

OKANO, H.; OHKUBO, C. Anti-pressor effects of whole body exposure to static magnetic field on pharmacologically induced hypertension in conscious rabbits. ***Bioelectromagnetics***, v. 24, p. 139–147, 2003.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. ***Journal of Neuroscience Methods***, v. 14, p. 149–167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Can Anti-Panic Drugs Antagonise the Anxiety Produced in the Rat by Drugs Acting at the GABA-Benzodiazepine Receptor Complex? **Neuropsychobiology**, v. 17, p. 60–65, 1987.

PICTON, H. D. Some responses of drosophila to weak magnetic and electrostatic fields. **Nature**, v. 211 (5046), p. 303–304, 1966.

REITER, R. J. Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure: reported effects on the circadian production of melatonin. **Journal Cell Biochemistry**, v. 51 (4), p. 394–403, 1993.

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

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

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacological methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDUE, C. A. editors. **Ethology and Psychopharmacology**. New York: Wiley; p. 9–44, 1994.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21 (6), p. 801–810, 1997b.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological in murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52 (2), p. 297-303, 1995.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWA, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and

response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior***, v. 54, p. 41-50, 1996.

ROSEN, A. D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. ***Biochemistry and Biophysics***, v. 39, p. 163–173, 2003a.

ROSEN, A. D. Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na⁺ channels in GH3 cells. ***Bioelectromagnetics***, v. 24 (7), p. 517-23, 2003b.

ROSEN, A. D. Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1148, p. 317-320, 1993.

ROSEN, A. D. Threshold and limits of magnetic field action at the presynaptic membrane. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1193, p. 62-66, 1994.

SAUNDERS, R. Static magnetic fields: animal studies. ***Progress in Biophysics and Molecular Biology***, v. 87, p. 225–239, 2005.

SELVAMURUGAN, N.; KWOK, S.; VASILOV, A.; JEFcoat, S. C.; PARTRIDGE, N. C. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. ***Journal of Orthopedic Research***, v. 25, p. 1213–122, 2007.

SERAFIM, K. R.; GIANLORENÇO, A. C. L.; DAHER, F. P.; MATTIOLI, R. H1-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. ***Brain Research Bulletin***, v. 89, p. 1–7, 2012.

SHEPARD, R. A. Neurotransmitters, anxiety and benzodiazepines: a behavioural review. ***Neuroscience and Biobehavioral Reviews***, v. 10, p. 449-461, 1986.

SHIMIZU, H.; OHGOH, M.; IKEDA, M.; NISHIZAWA, Y.; OGURA, H. Caspase-3-like protease activity-independent apoptosis at the onset of neuronal cell death in the gerbil hippocampus after global ischemia. **Biol Pharm Bull**, v. 30(10), p. 1950-1953, 2007.

SILVA, L. F. A.; HOFFMANN, M. S.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; LIMA, F. D.; FURIAN, A. F.; OLIVEIRA, M. S.; FIGHERA, M. R.; ROYES, L. F. The involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 308, p. 35–40, 2011.

SORREGOTTI, T.; MENDES-GOMES, J.; RICO, J. L.; RODGERS, R. J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behavioural Brain Research**, 246: 76-85, 2013.

SPENCE, A. L.; GUERIN, G. F.; GOEDERS, N.E. The differential effects of alprazolam and oxazepam on methamphetamine self-administration in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 166, p. 209–217, 2016.

STHAL, S. **Psicofarmacologia: Base neurocientífica e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Medesi, 2 ed, p. 311, 2002.

SUN, Z-C.; GE, J-I.; GUO, B.; GUO, J.; HAO, M.; WU, Y-C.; LIN, Y-A.; LA, T.; YAO, P-T.; MEI, Y-A.; FENG, Y; LEIXUE. Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Facilitate Vesicle Endocytosis by Increasing Presynaptic Calcium Channel Expression at a Central Synapse. **Scientific Reports**, p.1-11, 2016. Disponível em < <http://www.nature.com/articles/srep21774> >. Acesso em: 18 de março de 2016.

THIEL, C. M.; MULLER, C. P.; HUSTON, J. P.; SCHWARTING, R. K. High versus low reactivity to a novel environment: behavioral, pharmacological and neurochemical assessments. **Neuroscience**, v. 93, p. 243-51, 1999.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. ***Pharmacology, Biochemistry and Behavior***, v. 44, p. 463-469, 1993.

TUFIK, S. ***Medicina e Biologia do Sono***. Barueri: Manole, p. 188, 2008.

UZZBAY I. T.; LAL H. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester, 7- nitro indazole, and agmatine on pentylentetrazol-induced discriminative stimulus in Long-Evans rats. ***Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry***, v. 26 (3), p. 567-73, 2002.

VARGAS, K. M.; Da CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Amphetamine and pentylentetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. ***Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry***, v. 30, p. 1394–1402, 2006.

VILLALPANDO-VARGAS, F.; MEDINA-CEJA, L. Sparteine as an anticonvulsant drug: Evidence and possible mechanism of action. ***Seizure***, v. 39, p. 49-55, 2016.

WANG, Z.; HAO, F.; DING, C.; YANG, Z.; SHANG, P. Effects of static magnetic field on cell biomechanical property and membrane ultrastructure. ***Bioelectromagnetics***, v. 35, p. 251-261, 2014.

WALL, P. M.; MESSIER, C. The hippocampal formation—orbitomedial prefrontal cortex circuit in the attentional control of active memory. ***Behavioural Brain Research***, v. 127 (1/2), p. 99–117, 2001.

WEISS, J.; HERRICK, R. C.; TABER, K. H.; CONTANT, C.; PLISHKER, G. A. Bio-Effects Of High Magnetic Fields: A Study Using A Simple Animal Model. ***Magnetic Resonance Imaging***, v. 10, p. 689-694, 1992.

WINTER, B.; BERT, B.; FINK, H.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M. Dysexecutive syndrome after mildcerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. **Stroke**, v. 35, p. 191-195, 2004.