

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**Caracterização da ansiedade como comorbidade  
associada às epilepsias no modelo de crises  
*Wistar Audiogenic Rat (WAR)***

**Ana Maria Raymundi**

**Monografia apresentada ao Departamento de  
Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e  
Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2014**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Caracterização da ansiedade como comorbidade  
associada às epilepsias no modelo de crises  
*Wistar Audiogenic Rat (WAR)***

Ana Maria Raymundi

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

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

#### Ficha Catalográfica

Raymundi, Ana Maria

Caracterização da ansiedade como comorbidade associada às epilepsias no modelo de crises *Wistar Audiogenic Rat* (WAR)

Ribeirão Preto, SP, 2014

p 53

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP - Área: Neurofisiologia

Orientador: Garcia-Cairasco, Norberto

1. Epilepsia. 2. Ansiedade. 3. Comorbidades. 4. *Wistar Audiogenic Rat*. 5. WAR. 6. *Kindling* audiogênico.

Aos meus pais Braz e Ana Claudia, por terem me mostrado os valores da educação, serem para mim exemplos de dedicação e perseverança, e acima de tudo por todo o amor e apoio; também à minha irmã Ana Júlia por todo o companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco pela oportunidade, orientação e ensinamentos por todo o percurso desse projeto.

Ao Prof. Dr. Helio Zangrossi Jr. por ter sido co-orientador, concordado com a colaboração e permitido utilizar o espaço físico de seu laboratório para realização de parte dos experimentos.

A Ana Beatriz Sant' Ana do Nascimento por toda paciência, ajuda, ensinamento, correções de relatório, por ter me acompanhado no início, mesmo no fim de semana e ter aguentado tantos e-mails meus em sua caixa de entrada.

A Marília Gabriella Alves Goulart Pereira por ter possibilitado e auxiliado meus primeiros passos no LNNE e universo científico.

A toda equipe do LNNE, Victor, Eduardo, Polianna, Simone, Livea, Artur, Ana Luiza, Alexandra, também aos ex-membros com quem tive convivência Teddy, Poliana, Jéssica, Marília e aos técnicos Flávio e José Antônio, que auxiliaram direta ou indiretamente nesse trabalho e proporcionaram um ambiente de trabalho agradável.

À Prof. Dr. Elisabeth Spinelli de Oliveira e Victor Rodrigues Santos por aceitarem serem membros da banca examinadora, e também ao Dr. José Luiz Liberato e Ana Beatriz Sant' Ana do Nascimento por aceitarem serem membros suplentes, e de alguma forma poderem trazer opiniões e contribuições sobre esse trabalho.

Aos meus colegas da biologia, principalmente à quadragésima oitava turma incluindo aqueles que já fizeram parte e os que passaram a fazer com o tempo, pelos anos de convivência, especialmente aos mais próximos: Juliana, Priscilla, Felipe e Julia pelas risadas, apoio em todas as horas, conversas impróprias, parcerias em trabalhos, jantares em véspera de prova, enfim todos os momentos, que tornaram os dias de graduação um pouco mais felizes, são amizades que quero levar pra sempre.

À toda a equipe de docentes do departamento de Biologia e todos aqueles que ministraram aulas durante a minha graduação, pelo ensinamento e terem contribuído com a minha formação.

Às agências de fomento a pesquisa FAPESP, CNPq e CAPES pelo financiamento aos Laboratórios envolvidos nesse Projeto e em especial ao CNPq pela Bolsa de Iniciação Científica.

Aos meus amigos distantes, dos quais durante esses anos de graduação quilômetros nos separaram, e poucos dias em férias e feriados prolongados nos reuniam, e também àqueles que isso não era possível, mas que mesmo a distância ajudaram com que a permanência na Universidade fosse um pouco melhor.

As minhas colegas de apartamento, pela convivência diária, nem sempre a mais agradável, mas ainda assim, uma companhia nos mais diversos momentos durante todos esses anos.

À minha família, em especial meus pais, por todo o apoio, por, desde sempre investirem na minha educação, apoiado as minhas escolhas, terem aprendido a conviver com a distância e a saudade, serem um porto seguro mesmo que à distância, por todos os abraços e palavras de conforto, enfim, por todo o amor. Também a minha irmã que quando saí era “inha” e agora já é praticamente maior que eu, por compreender a minha ausência e ser minha eterna amiga onde quer que eu esteja.

Em suma, a todos aqueles com quem tive convivência pelo período de graduação e desenvolvimento desse projeto, que me auxiliaram de alguma forma ou de outra, o meu muito obrigada!

## Resumo

A ansiedade é a segunda comorbidade psiquiátrica mais frequente em pacientes com epilepsia, distúrbio neurológico crônico caracterizado pela presença de crises epiléticas. Nos estudos experimentais de epilepsia, crises epiléticas repetidas podem ser induzidas por som, sendo essa abordagem conhecida como *kindling* audiogênico. Ao serem submetidos a esse protocolo, animais susceptíveis às crises, inicialmente apresentam crises tônico-clônicas generalizadas que são geradas pelos núcleos do tronco cerebral. Com a cronicidade da evocação das crises, há o surgimento de crises límbicas, geradas por núcleos do prosencéfalo. Com base nas respostas à estimulação sonora (120 dB), animais *Wistar* susceptíveis a crises audiogênicas foram selecionados e por cruzamentos endogâmicos deram origem à cepa *Wistar audiogênic rat (WAR)*. Ratos WAR comparados a ratos *Wistar* quando avaliados no labirinto em cruz elevado apresentaram um perfil ansiogênico, adicionalmente a avaliação no labirinto em T elevado evidenciou uma resposta do tipo panicolítica da cepa. Além disso, também foi observada uma menor exploração desses animais no teste do campo aberto. Tendo em vista esses achados, o presente trabalho buscou estender a investigação a respeito do possível perfil ansiogênico da cepa WAR utilizando outro modelo preditivo de ansiedade, o teste de conflito de Vogel. Para tanto, ratos WAR (n=10) e *Wistar* (n=10) machos com 60 dias foram privados de água por 48 horas antes do teste. Durante o teste, a cada 20 lambidas, os animais receberam um choque de 0,5 mA por 2 s através do bico do bebedouro, sendo que o número de lambidas punidas foi registrado. Após 20 dias iniciou-se o *kindling* audiogênico, consistindo de 20 estímulos sonoros, dois ao dia, durante 10 dias. Uma semana após o fim do *kindling* audiogênico os animais foram submetidos novamente ao teste de conflito de Vogel. Nenhuma diferença foi encontrada entre os animais WAR e *Wistar*, sem terem passado por nenhum estímulo acústico, porém após o *kindling* audiogênico, foi observado um perfil do tipo ansiogênico nos animais WAR em comparação aos *Wistar*, caracterizado por um menor número de lambidas punidas [ $t(18) = 2,346$ ;  $p < 0,05$ ]. Acredita-se que essa diferença esteja relacionada à ativação de áreas do sistema límbico, córtex, hipocampo e amígdala, durante o *kindling* audiogênico, eventos estes já documentados por meio de análises comportamentais e de EEG em nosso laboratório.

**Palavras chaves:** epilepsia, ansiedade, comorbidades, *Wistar Audiogenic Rat*, WAR, *kindling* audiogênico

## **Abstract**

Anxiety is the second most frequent psychiatric comorbidity in patients with epilepsy, a chronic neurological disorder characterized by convulsive or non-convulsive seizures. In experimental epilepsy studies, repeated seizures can be induced by sound and this approach is known as audiogenic kindling. When subjected to this protocol, susceptible animals initially presented tonic-clonic seizures, generated by brainstem nuclei. With chronic induction of seizures, there is the emergence of limbic seizures generated by forebrain nuclei. Based on the responses to sound stimulation (120 dB), Wistar rats susceptible to audiogenic seizures were selected, and inbred crosses gave rise to the Wistar audiogênic rat (WAR) strain. Previous studies have shown that when evaluated in the elevated plus maze WARs compared to Wistar showed an anxiogenic profile. Additionally, evaluation in the elevated T maze showed a panicolitic-like response and a decreased locomotion in the open field was also observed. Given these findings, this study sought to extend the investigation of the possible anxiogenic profile of WAR strain using another predictive model of anxiety, the Vogel conflict test. For this purpose, 60-day-old male rats, Wistar (n=10) and WAR (n=10), were water-deprived for 48 h prior to the test. During the test period, the animals received a 0.5-mA shock for 2 s through the bottle spout every 20 licks and the number of punished licks was recorded. After 20 days, the rats were repetitively stimulated twice a day during 10 days (20 stimuli in total). One week after the end of audiogenic kindling, the animals were submitted again to the Vogel conflict test. No difference was found between WAR and Wistar rats, without having undergone any acoustic stimulus, but after audiogenic kindling, we observed an anxiogenic-like profile in WAR rats compared to Wistar, characterized by a smaller number of punished licks [ $t(18) = 2,346$ ;  $p < 0,05$ ]. It is believed this difference is related to activation of limbic areas, such as cortex, hippocampus and amygdala in the audiogenic kindling, events which were already documented by means of behavioral and EEG analyses in our Lab.

**Key words:** epilepsy, anxiety, comorbidities, Wistar Audiogenic Rat, WAR, audiogenic kindling

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de gravidade de crises mesencefálicas segundo Rossetti *et al.* (2006). pg.13

Tabela 2: Índice de gravidade das crises límbicas segundo Racine (1972) modificado por Pinel e Rovner (1978). pg.14

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Média (+ EPM) do número de lambidas punidas dos animais WAR e *Wistar*, sem terem passado por nenhum estímulo acústico (n=10 por grupo). p=NS. Análise estatística pelo teste *t* Student. pg. 17

Figura 2. Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises mesencefálicas e límbicas dos animais WAR submetidos ao *kindling* audiogênico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. p=NS. Análise estatística pelo teste ANOVA de medidas repetidas. pg. 18

Figura 3. Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises mesencefálicas e límbicas dos animais *Wistar* submetidos ao *kindling* audiogênico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. p = NS. Análise estatística pelo teste ANOVA de medidas repetidas. pg. 18

Figura 4. Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises mesencefálicas dos animais WAR e *Wistar* submetidos ao *kindling* audiogênico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. p<0,0001. Análise estatística pelo teste *t* Student. pg. 19

Figura 5. Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises límbicas dos animais WAR e *Wistar* submetidos ao *kindling* audiogênico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. p<0,05. Análise estatística pelo teste *t* Student. pg. 20

Figura 6. Média (+ EPM) das latências para a primeira corrida dos animais WAR e *Wistar* (que apresentaram resposta à estimulação acústica) submetidos ao *kindling* audiogênico no decorrer dos 20 estímulos acústicos. Valores expressos em segundos. p<0,0001. Análise estatística pelo teste *t* Student. pg. 21

Figura 7. Média (+ EPM) do número de lambidas punidas dos animais WAR e *Wistar* sete dias após terem passado pelo *kindling* audiogênico (n=10 por grupo). \* p<0,05. Análise estatística pelo teste *t* Student. pg. 22

Figura 8. Média (+ EPM) do número de lambidas dos animais WAR e *Wistar* na sessão treino (dia anterior ao teste, choque desligado) seis dias após terem passado pelo *kindling* audiogênico (n= 10 por grupo). p=NS. Análise estatística pelo teste *t* Student. pg. 23

**Figura 9.** Média (+ EPM) do número de lambidas punidas dos animais WAR e *Wistar* antes e após terem passado pelo *kindling* audiogênico (n=10 por grupo). \*\*\* p<0,001. Análise estatística pelo teste ANOVA de duas vias com teste posterior de Bonferroni. pg. 24

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

cm – centímetros

dB – decibéis

EEG – eletrencefalograma

EPM – erro padrão da média

GAERS - *Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg*

h – horas

HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal

Hz – Hertz

LCE – labirinto em cruz elevado

LTE – labirinto em T elevado

mA – miliamperes

NS – não significativo

p – nível de significância

s – segundos

WAR – *Wistar Audiogenic Rat*

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Epilepsia e ansiedade como comorbidade associada .....	2
1.2. <i>Wistar Audiogenic Rat</i> (WAR): Modelo genético de crises audiogênicas .....	4
1.3. Ratos WAR em modelos de ansiedade .....	5
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>10</b>
3.1. Animais .....	11
3.2. Aparatos .....	11
3.2.2. Teste de conflito de Vogel .....	11
3.2.3. <i>Kindling</i> audiogênico .....	12
3.3. Procedimentos experimentais .....	12
3.3.1. Teste de conflito de Vogel .....	12
3.3.2. <i>Kindling</i> audiogênico .....	13
3.3.3. Reexposição ao teste de conflito de Vogel .....	14
3.4. Análise estatística .....	14
<b>4. Resultados</b> .....	<b>16</b>
4.1. Teste de conflito de Vogel .....	17
4.2. <i>Kindling</i> audiogênico .....	17
4.3. Reexposição ao teste de conflito de Vogel .....	21
<b>5. Discussão</b> .....	<b>25</b>
<b>6. Conclusões</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>34</b>

## *INTRODUÇÃO*

## **1. Introdução**

### **1.1. Epilepsia e ansiedade como comorbidade associada**

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico que atinge pelo menos 1% da população (Shneker & Fountain, 2003). Não é uma doença singular, mas uma variedade de desordens, caracterizadas predominantemente pelas crises epiléticas, convulsivas ou não, que podem resultar de muitas causas distintas, sendo definidas por uma constelação de sinais e sintomas, incluindo tipos de crises características que refletem a localização e extensão da perturbação cerebral, bem como diversos mecanismos envolvidos (Engel, 1995).

As crises epiléticas, por sua vez, consistem em interrupções recorrentes e imprevisíveis da função normal do cérebro (Fisher *et al.*, 2005), e essas são caracterizadas EEG-graficamente em descargas tipo ponta-onda, refletindo um processo de despolarização e subsequente hiperpolarização anormal que ocorre na região epileptogênica. (Engel, 1995).

Pacientes epiléticos tem suas funções sociais, profissionais e psicológicas afetadas. Adicionalmente, vários distúrbios psiquiátricos como ansiedade, depressão, desordens bipolares e outras psicoses apresentam maior prevalência em pessoas com epilepsia quando comparados à população em geral (Gilliam *et al.*, 2003), podendo serem considerados comorbidades, ou seja, condições patológicas que co-ocorrem e que podem dividir os mesmos mecanismos (Gaitatzis *et al.*, 2004). De especial interesse para o presente trabalho, os transtornos de ansiedade são a segunda comorbidade psiquiátrica mais frequente em pacientes com epilepsia (Tellez-Zenteno *et al.*, 2007).

A ansiedade pode ser definida como um estado emocional caracterizado por alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivas, que resultam em uma experiência subjetiva não prazerosa e desconfortável. Até um determinado nível, essa ansiedade tem grande valor adaptativo favorecendo a motivação e o desempenho do indivíduo e, tem suas raízes nas reações de defesa dos animais em resposta a perigos no meio ambiente. Por outro lado, pode tornar-se patológica quando manifestada em níveis exacerbados, que ao contrário, prejudicam o funcionamento normal do indivíduo, caracterizando quadros clínicos de transtornos de ansiedades (Griebel *et al.*, 1995; Graeff, 1999; Graeff, 2004).

Estudos mostram que, dentre os pacientes com epilepsia, a porcentagem dos que possuem algum transtorno de ansiedade é aproximadamente o dobro em comparação ao percentual da população em geral (Tellez-Zenteno *et al.*, 2007; Brandt *et al.*, 2010; Kanner, 2011). E dessa forma, essa comorbidade tem grande impacto na vida das pessoas, como mostrado em um estudo sul-coreano, em que a presença de sintomas de ansiedade foi o fator mais importante que explicava uma qualidade de vida ruim dos pacientes com epilepsia (Choi-Kwon *et al.*, 2003).

Assim sendo, a avaliação dos níveis de ansiedade em animais, que servem como modelos de laboratório para estudos de mecanismos de epilepsia, é importante para detectar uma possível relação entre a predisposição às crises e a ansiedade. Como exemplo há um estudo com os *Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg* (GAERS), um modelo animal da epilepsia generalizada humana (crises de ausência), mostrando que esses

animais apresentam comportamento do tipo ansiogênico, caracterizado por menor tempo de exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), além de atividade exploratória reduzida e menor tempo no centro da arena no teste do campo aberto, ambos modelos preditivos de ansiedade (Jones *et al.*, 2008).

### **1.2. *Wistar Audiogenic Rat (WAR)*: Modelo genético de crises audiogênicas**

Nos estudos de epilepsia que utilizam animais de laboratório, crises epilépticas repetidas podem ser induzidas por som em animais susceptíveis, sendo essa abordagem conhecida como *kindling* audiogênico (Marescaux *et al.*, 1987). Sabe-se que inicialmente, as crises induzidas são tônico-clônicas generalizadas, caracterizadas por corridas, pulos e quedas atônicas, sendo geradas em núcleos do tronco cerebral, também denominadas como crises mesencefálicas. Com a evocação crônica das crises o que se observa é o aparecimento de comportamentos típicos de crises límbicas, como automatismos orofaciais, clonias, postura ereta e queda, que estão associados à ativação neuronal do córtex, hipocampo e amígdala (Marescaux *et al.*, 1987; Naritoku *et al.*, 1992). Em linhas gerais, com a cronicidade há uma indução gradativa de transferência da atividade epiléptica do tronco cerebral para núcleos prosencefálicos (Garcia-Cairasco *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 2000; Garcia-Cairasco, 2002; Romcy-Pereira & Garcia-Cairasco, 2003).

Com base em respostas comportamentais à estimulação sonora (120 dB), ratos *Wistar* susceptíveis a crises audiogênicas foram selecionados pelo nosso

grupo de pesquisa e, a partir de cruzamentos endogâmicos, deram origem à cepa denominada *Wistar Audiogenic Rat* (WAR). Os critérios para a seleção foram: maior índice de gravidade das crises e menores latências da primeira corrida (Doretto *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que os animais da cepa WAR possuem diversas comorbidades como pressão arterial e frequência cardíaca elevadas (Fazan *et al.*, 2011), hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Umeoka *et al.*, 2011) e comportamento de autolimpeza exacerbada associado à compulsão (*hypergrooming*) (Marroni *et al.*, 2009). Além disso, uma série de estudos relacionados às comorbidades da cepa WAR se encontram em desenvolvimento em nosso laboratório.

### **1.3. Ratos WAR em modelos de ansiedade**

Garcia-Cairasco e colaboradores (1998), sem a apresentação de nenhum estímulo prévio, submeteram ratos sensíveis e ratos resistentes às crises audiogênicas ao teste do LCE. Brevemente, esse teste é realizado em um aparato que possui dois braços abertos e dois braços fechados, sendo que efeitos do tipo ansiolíticos são demonstrados por uma maior exploração dos braços abertos (componente aversivo), enquanto os do tipo ansiogênicos por uma maior exploração dos braços fechados (Pellow *et al.*, 1985). Os resultados obtidos apontaram uma menor exploração dos braços abertos do LCE realizada pelos ratos sensíveis, em comparação aos resistentes, sugerindo que os animais sensíveis às crises audiogênicas apresentavam um perfil do tipo ansiogênico. Testes realizados, também, no campo aberto indicaram uma menor distância percorrida dos ratos sensíveis em relação aos resistentes (Garcia-Cairasco *et al.*, 1998).

As classificações clínicas reconhecem a existência de diversos tipos de ansiedade, dentre elas o transtorno de ansiedade generalizada, o transtorno do pânico, o transtorno obsessivo-compulsivo, fobias e estresse pós traumático; e esses diversos tipos podem envolver diferentes mecanismos e áreas cerebrais (Deakin & Graeff, 1991). Assim, a fim de melhor compreender os diferentes transtornos de ansiedade como comorbidade associada às epilepsias, ratos da cepa WAR e ratos *Wistar* foram avaliados no teste do labirinto em T elevado (LTE).

Este teste, derivado do LCE, é constituído apenas por um braço fechado e dois braços abertos (Graeff *et al.*, 1993b); permitindo a avaliação, em um mesmo animal, de dois comportamentos distintos: esquiva inibitória, que é medido registrando o tempo levado pelo animal para sair do braço fechado, e fuga, que é medido pelo tempo de escape de um dos braços abertos. De acordo com estudos de validação farmacológica, esses comportamentos estão relacionados com dois diferentes transtornos de ansiedade, o de ansiedade generalizada e o de pânico, respectivamente. Resumidamente, um tempo maior para a saída do braço fechado representa um perfil ansiogênico, enquanto um tempo menor, ansiolítico; da mesma forma, uma maior latência de fuga dos animais explicita um comportamento do tipo panicolítico, enquanto uma menor, um comportamento do tipo panicogênico (para revisão ver Blanchard *et al.*, 2011).

Tendo isso em vista, os resultados obtidos no LTE mostraram uma latência de fuga maior dos ratos WAR comparada a dos ratos *Wistar*, o que possivelmente explicita um perfil panicolítico, porém os animais da cepa WAR

apresentam atividade locomotora diminuída quando avaliados no teste do campo aberto e esta característica parece ter contribuído para os resultados obtidos no LTE (Oliveira *et al.*, 2005).

Os modelos do LCE e do LTE, em linhas gerais, evocam no animal determinados comportamentos diante de uma situação de conflito simulada que é gerada pelo medo de se expor a espaços abertos e elevados, em contraposição à tendência exploratória natural do animal (para revisão ver Sudakov *et al.*, 2013), sendo o componente locomotor muito presente na execução do teste.

O teste de conflito de Vogel, modelo preditivo de ansiedade utilizado na presente investigação, envolve o componente locomotor em menor grau, uma vez que neste modelo, os animais passam por um período de privação de água, e posteriormente são expostos ao conflito entre lamber o bico de uma garrafa contendo água e receber um choque elétrico suave sobre a língua. Neste teste, o efeito do tipo ansiolítico é caracterizado pelo aumento no número de lambidas punidas, enquanto que o efeito ansiogênico pelo fenômeno oposto (Vogel *et al.*, 1971).

Diante do exposto, o presente trabalho estendeu a avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade na cepa WAR, submetendo os animais ao teste de conflito de Vogel, objetivando uma melhor caracterização de seu suposto quadro ansiogênico e também averiguar possíveis efeitos comportamentais induzidos pelo *kindling* audiogênico nos animais da cepa.

*OBJETIVOS*

## **2. Objetivos**

Caracterizar a ansiedade como comorbidade associada às epilepsias na cepa WAR, analisando o comportamento dos animais no teste de conflito de Vogel e verificar possíveis efeitos comportamentais induzidos pelo *kindling* audiogênico na resposta a esse mesmo teste.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados um total de 20 ratos machos, sendo 10 ratos da cepa WAR e 10 ratos da linhagem *Wistar*, ambos com 60 dias. Foi-se utilizado animais dessa idade, pois trabalhos anteriores do nosso laboratório em modelos comportamentais de ansiedade e memória emocional (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006) também utilizaram e assim, os resultados do presente trabalho poderiam ser comparáveis a esses.

Os animais da cepa WAR foram obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e os ratos da linhagem *Wistar* do biotério central da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em ambiente ventilado com filtração do ar, temperatura constante ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), fotoperíodo de doze horas (7:00h-19:00h) e livre acesso à alimento e água, exceto durante o período de privação de água. Todos os protocolos utilizados seguiram as normas internacionais de ética para uso de animais.

#### **3.2 Aparatos**

##### **3.2.1. Teste de Conflito de Vogel**

O aparato utilizado na realização do teste de conflito de Vogel fica no interior de uma gaiola de isolamento acústico e consiste em uma caixa de Plexiglas (42 x 25 x 20 cm) com uma grade de aço inoxidável no chão e uma garrafa com bico de metal contendo água. O contato do animal com o bico e o

assoalho fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (Insight, Brasil) que produz 7 pulsos/s quando o animal está em contato com os dois componentes, sendo que cada pulso foi considerado uma lambida, e a cada 20 lambidas, o animal recebeu, do bico, um choque elétrico de 0,5 mA, durante dois segundos. O sensor registrou o número de lambidas e choques durante o período do teste.

### **3.2.2. *Kindling* audiogênico**

O aparelho consistiu em uma gaiola cilíndrica acústica (32 x 36 cm) transparente, dentro de uma caixa de madeira maior, à prova de som, com portas de vidro frontais. Os animais foram expostos a um som de alta intensidade (120 dB e 60 Hz) fornecidos por uma gravação no computador e entregue à câmara acústica através de um alto-falante presente na parte superior da gaiola cilíndrica.

## **3.1 – Procedimentos experimentais**

### **3.3.1 – Teste de conflito de Vogel**

Dois dias antes do início do teste, os animais, sem nenhum estímulo acústico, foram manuseados pelo experimentador, uma vez ao dia, durante cinco minutos. No dia seguinte à última sessão de habituação, os animais foram privados de água por 48 horas antes do teste. Após as primeiras 24 horas, na sessão treino, foi permitido a cada animal beber livremente na caixa-teste por três minutos, procedimento realizado para que o animal encontre o bico do bebedouro. 24 horas após a sessão treino, os animais foram individualmente colocados na caixa-teste por três minutos, contados a partir do

momento em que o bico do bebedouro foi encontrado. Durante este período, a cada 20 lambidas, os animais receberam, através do bico do bebedouro, um choque de 0,5 mA durante dois segundos.

### 3.3.2 – *Kindling* Audiogênico

Os mesmos animais, após 20 dias, passaram pelo *kindling* audiogênico, que consiste na estimulação acústica por um som de alta intensidade até o aparecimento de crises tônico-clônicas ou o tempo máximo de um minuto. Além do tempo de duração do estímulo, os animais foram observados durante um minuto antes e um minuto após o mesmo. Os estímulos foram feitos duas vezes ao dia (8-10 h e 16-18 h) por 10 dias, totalizando 20 estímulos.

O índice de gravidade das crises mesencefálicas foi determinado com base no índice categorizado por Rossetti e colaboradores, 2006 (Tabela 1) e das crises límbicas pelo índice de Racine (1972) modificado por Pinel e Rovner em 1978 (Tabela 2) a partir da observação dos comportamentos realizados por cada animal em cada estímulo. Também foi observado o tempo de latência à primeira corrida nos animais que responderam à estimulação acústica.

**Tabela 1.** Índice de gravidade de crises mesencefálicas segundo Rossetti *et al.* (2006).

<b>Índice</b>	<b>Comportamento</b>
0	Sem crise
1	Uma corrida e giros
2	Giro, corrida, pulo e queda atônica
3	Duas corridas, giros e queda atônica
4	Comportamentos anteriores e convulsão tônica
5	Comportamentos anteriores e clonias parciais e generalizadas
6	Comportamentos anteriores e flexão de cabeça
7	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas anteriores
8	Comportamentos anteriores e hiperextensão das patas posteriores

**Tabela 2.** Índice de gravidade das crises límbicas segundo Racine (1972) modificado por Pinel e Rovner (1978).

<b>Índice</b>	<b>Comportamento</b>
0	Sem crise
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de orelha, cabeça e tronco
3	Comportamentos anteriores e clonias das patas anteriores
4	Comportamentos anteriores e elevação
5	Comportamentos anteriores e queda
6	Comportamentos anteriores e várias quedas
7	Comportamentos anteriores e corrida
8	Comportamentos anteriores e crises tônico-clônicas

### **3.3.3. Reexposição ao Teste de conflito de Vogel**

Após sete dias do término do *kindling* audiogênico, os animais foram novamente submetidos ao protocolo do teste de conflito de Vogel, passando pelas mesmas etapas descritas no item 3.3.1 (privação de água, sessão treino e sessão teste).

### **3.4. Análise estatística**

Os dados obtidos no teste de conflito de Vogel foram submetidos à análise estatística pelo teste *t* Student na comparação dos dados de mesma sessão e ao teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, com teste posterior de Bonferroni na comparação dos dados obtidos antes e após o *kindling* audiogênico.

Dos dados obtidos no *kindling* audiogênico, os índices de crises mesencefálicas e os índices de crises límbicas foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA de medidas repetidas, como utilizada em Oliveira *et al.*, 2004 e Doretto *et al.*, 2009, na comparação entre os estímulos. A

comparação entre os grupos (WAR e *Wistar*) dos índices de gravidade e também das latências para a primeira corrida foi feita pelo test *t* Student.

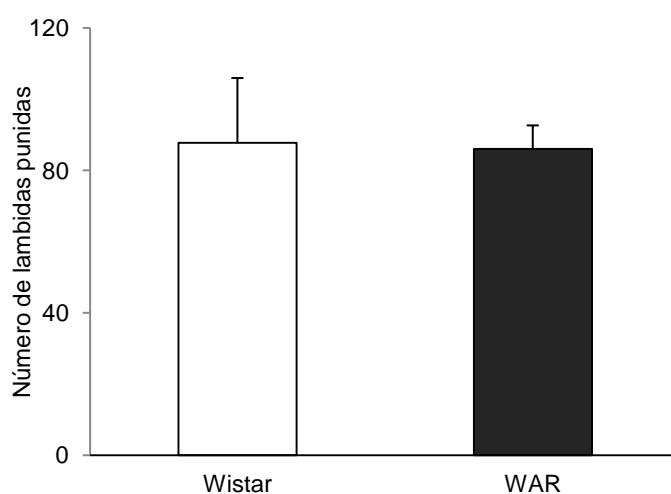
Todos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (EPM).

*RESULTADOS*

## 4. Resultados

### 4.1. Teste de conflito de Vogel

O comportamento dos animais que foram submetidos ao teste de conflito de Vogel, sem nenhum estímulo acústico é representado na Figura 1. A análise estatística pelo teste *t* Student não apontou diferença significativa entre os grupos de animais WAR e *Wistar* [ $t(18) = 0,117$ ; NS].

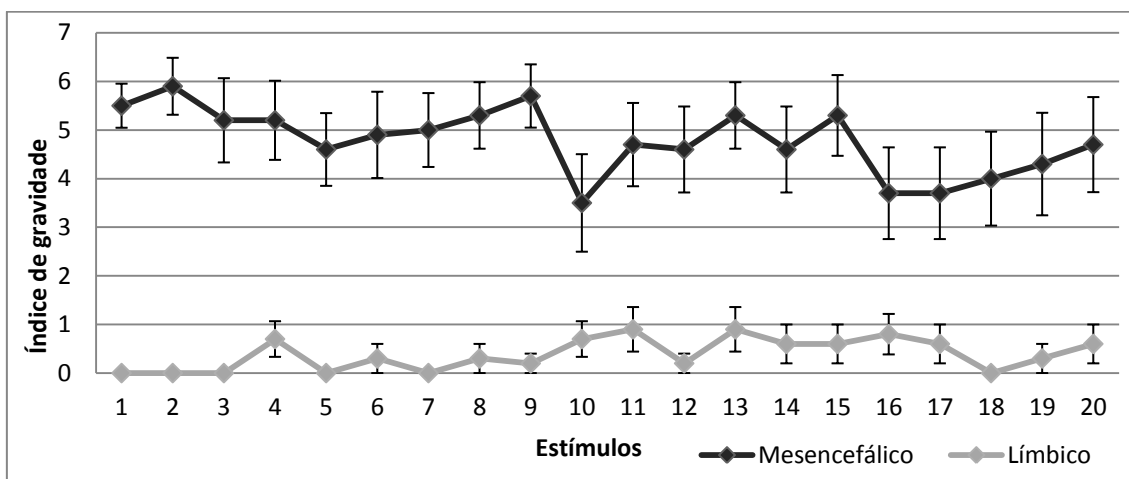


**Figura 1.** Média (+ EPM) do número de lambidas punidas dos animais WAR e *Wistar*, sem terem passado por nenhum estímulo acústico (n=10 por grupo).  $p=NS$ . Análise estatística pelo teste *t* Student.

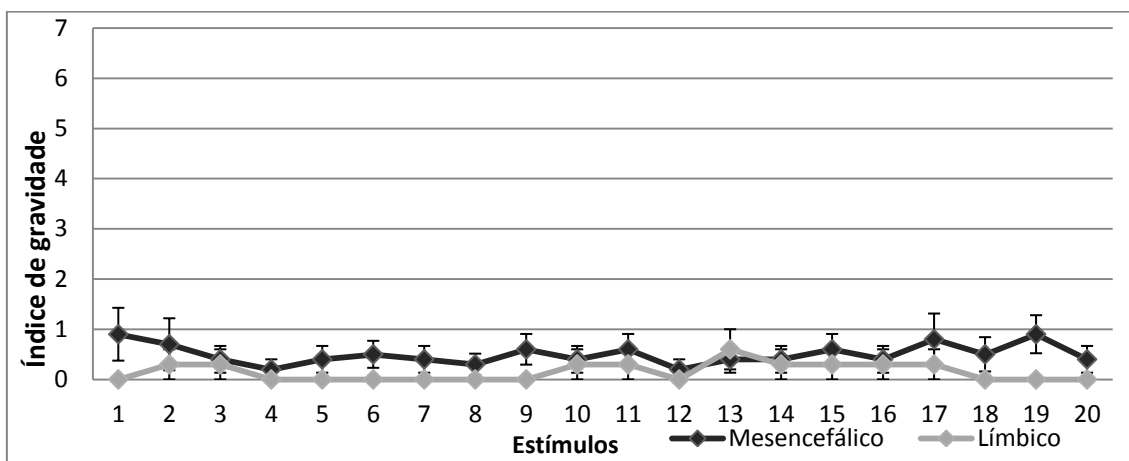
### 4.2 – Kindling audiogênico

As Figuras 2 e 3 representam a variação dos índices de gravidade das crises mesencefálicas e límbicas dos animais WAR e *Wistar*, respectivamente. Nos animais WAR é possível observar o recrutamento de áreas límbicas a partir do quarto estímulo, acompanhado de uma pequena diminuição dos índices mesencefálicos, sendo essa diminuição mais evidente no décimo, décimo sexto e décimo sétimo estímulo, apesar desse evento não ter sido estatisticamente significativo, ao se realizar o teste de ANOVA, fazendo a

comparação entre os estímulos:  $[F(1,105) = 0,3499; NS]$  para os índices mesencefálicos e  $[F(1,529) = 0,0809; NS]$  para os índices límbicos. A análise com os estímulos dos ratos *Wistar* também não apontou diferenças significativas:  $[F(0,6985) = 0,8171; NS]$  para os índices mesencefálicos e  $[F(0,9403) = 0,5343; NS]$  para os índices límbicos.

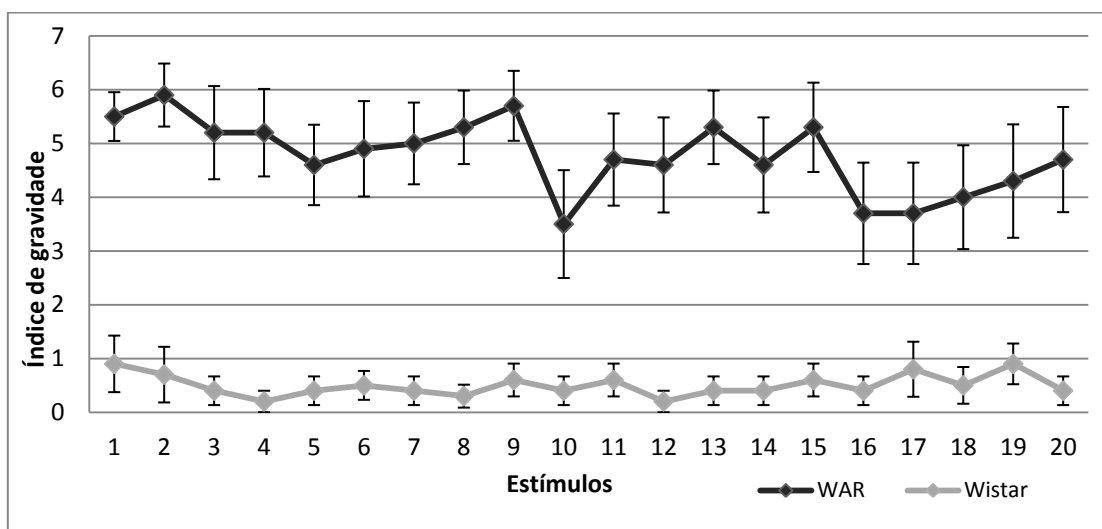


**Figura 2.** Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises mesencefálicas e límbicas dos animais WAR submetidos ao *kindling* audiogênico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. p=NS. Análise estatística pelo teste ANOVA de medidas repetidas.



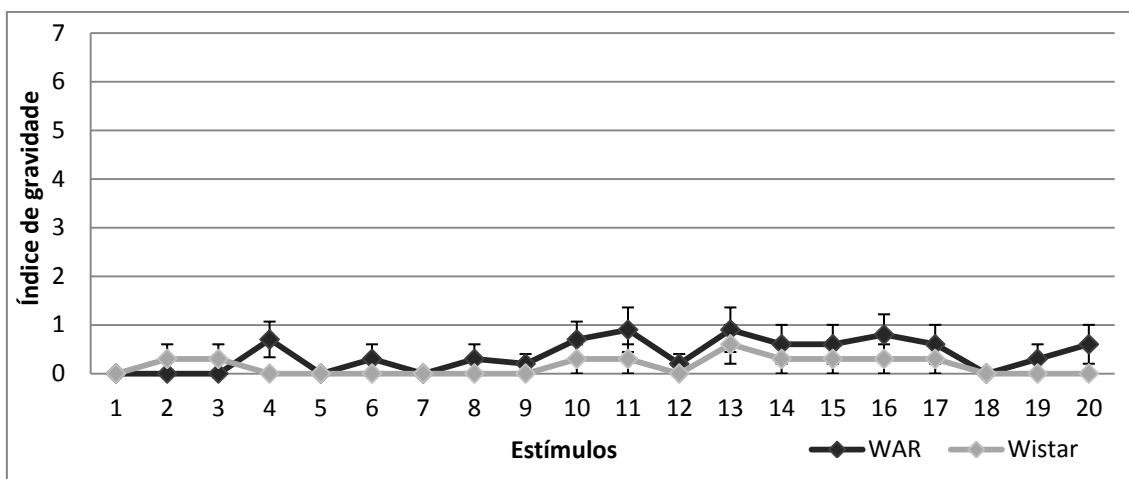
**Figura 3.** Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises mesencefálicas e límbicas dos animais *Wistar* submetidos ao *kindling* audiogênico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos. p = NS. Análise estatística pelo teste ANOVA de medidas repetidas.

A Figura 4 ilustra a comparação entre os índices de gravidade das crises mesencefálicas dos ratos WAR e *Wistar* no decorrer dos estímulos. É possível observar que os índices mesencefálicos nos animais WAR são consideravelmente mais altos que dos animais *Wistar* em todos os estímulos. A análise estatística *t* Student demonstrou que os grupos são significativamente diferentes [ $t(38) = 27,04$ ;  $p < 0,0001$ ]. O índice de gravidade das crises mesencefálicas nos WAR manteve-se na média de  $4,785 \pm 0,1519$ , enquanto nos *Wistar* na média de  $0,5000 \pm 0,04531$ .



**Figura 4.** Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises mesencefálicas dos animais WAR e *Wistar* submetidos ao *kindling* audiogênico ( $n=10$ ) no decorrer dos 20 estímulos acústicos.  $p < 0,0001$ . Análise estatística pelo teste *t* Student.

A Figura 5 ilustra a comparação entre os índices de gravidade das crises límbicas dos ratos WAR e *Wistar* no decorrer dos estímulos. A análise estatística *t* Student demonstrou que os grupos são significativamente diferentes [ $t(38) = 2,790$ ;  $p < 0,05$ ].

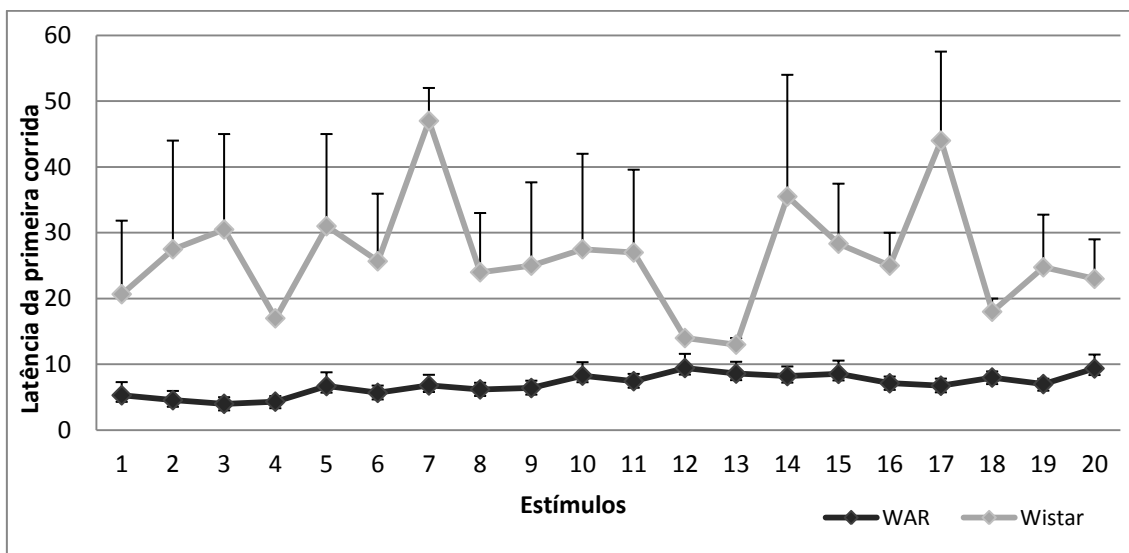


**Figura 5.** Média (+ EPM) dos índices de gravidade das crises límbicas dos animais WAR e *Wistar* submetidos ao *kindling* audiológico (n=10) no decorrer dos 20 estímulos acústicos.  $p < 0,05$ . Análise estatística pelo teste *t* Student.

Todos os animais WAR apresentaram resposta à estimulação acústica, sendo que 60% tiveram crises tônico-clônicas generalizadas em pelo menos 80% dos estímulos. Adicionalmente, 60% dos animais WAR apresentaram comportamento límbico, caracterizados por automatismos e mioclônias, e desses animais, 66,66% apresentaram em mais de um estímulo. Dos animais *Wistar*, 50% apresentaram resposta à estimulação acústica, porém crises tônico-clônicas generalizadas foram observadas em apenas 30% dos animais uma única vez, sem apresentar flexão de cabeça ou hiperextensão de patas, que foram observadas nos ratos WAR. Apenas um animal *Wistar* apresentou comportamento límbico em mais de um estímulo.

Além dos índices de gravidade, as latências da primeira corrida dos animais WAR e *Wistar* (que apresentaram resposta à estimulação acústica) também foram analisadas, e estão representados na Figura 6. A análise estatística *t* Student demonstrou que os grupos são significativamente diferentes [ $t(38) = 9,940$ ;  $p < 0,0001$ ]. As latências dos ratos WAR tiveram média

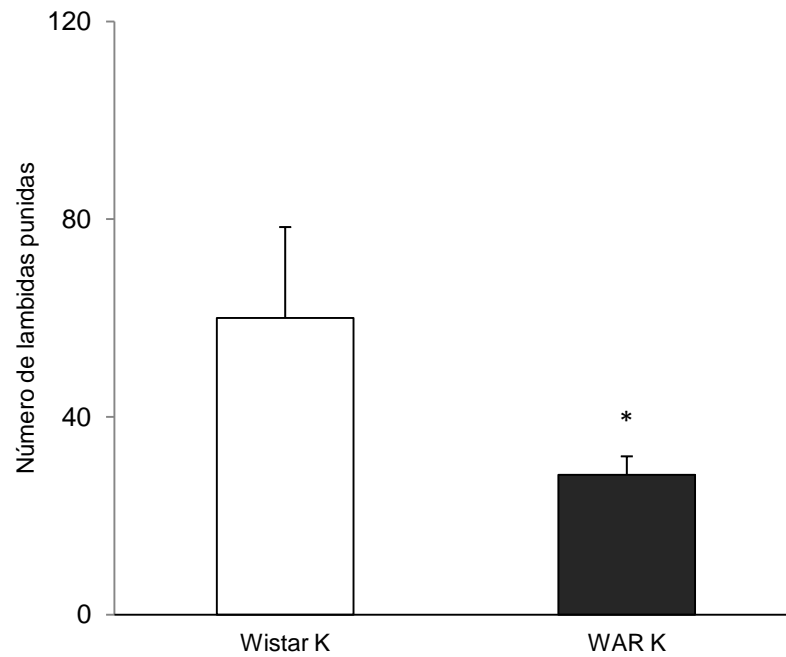
de  $6,938s \pm 0,3585$ , enquanto as dos ratos *Wistar*,  $26,42s \pm 1,927$  apesar da grande variação observada durante os estímulos.



**Figura 6.** Média (+ EPM) das latências para a primeira corrida dos animais WAR e *Wistar* (que apresentaram resposta à estimulação acústica) submetidos ao *kindling* audiogênico no decorrer dos 20 estímulos acústicos. Valores expressos em segundos.  $p < 0,0001$ . Análise estatística pelo teste *t* Student.

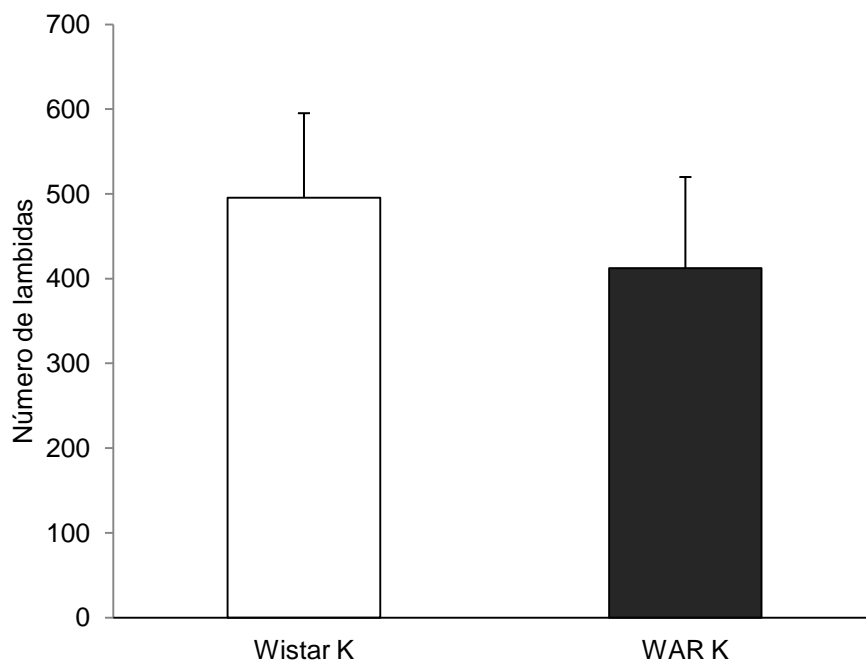
### 4.3 – Reexposição ao Teste de conflito de Vogel

A Figura 7 ilustra o comportamento dos mesmos animais reexpostos ao teste de conflito de Vogel, uma semana após terem sido submetidos ao *kindling* audiogênico. O teste *t* Student apontou diferença significativa entre os grupos [ $t(18) = 2,346$ ;  $p < 0,05$ ], sendo que o número de lambidas punidas dos animais WAR foi menor do que dos animais *Wistar*.



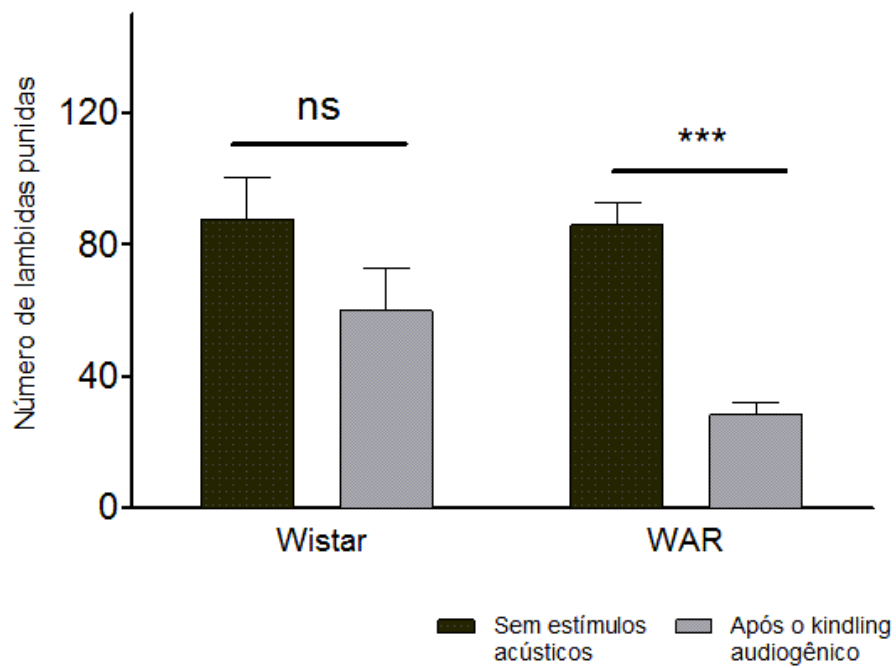
**Figura 7.** Média (+ EPM) do número de lambidas punidas dos animais WAR e *Wistar* sete dias após terem passado pelo *kindling* audiogênico (n=10 por grupo). \*  $p < 0,05$ . Análise estatística pelo teste *t* Student.

Para verificar se a diferença encontrada não é decorrente de uma alteração basal na ingesta de água e buscando evitar o uso de animais em demasia, decidiu-se analisar o número de lambidas da sessão treino dos animais após terem passado pelo *kindling* audiogênico, sendo o comportamento ilustrado na Figura 8. O teste *t* Student não apontou diferença significativa entre os grupos de animais WAR e *Wistar* [ $t(18) = 0,5672$ ; NS].



**Figura 8.** Média (+ EPM) do número de lambidas dos animais WAR e *Wistar* na sessão treino (dia anterior ao teste, choque desligado) seis dias após terem passado pelo *kindling* audiogênico (n= 10 por grupo). p= NS. Análise estatística pelo teste *t* Student.

Adicionalmente, foi feita uma comparação geral dos dados obtidos no teste de conflito de Vogel, antes e após o *kindling* audiogênico, explicitado pela Figura 9. A análise estatística ANOVA de duas vias com teste posterior de Bonferroni apontou uma diferença significativa entre o número de lambidas punidas antes do *kindling* audiogênico e após o *kindling* audiogênico nos ratos WAR ( $p < 0.001$ ) e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos equivalentes nos ratos *Wistar*.



**Figura 9.** Média (+ EPM) do número de lambidas punidas dos animais WAR e *Wistar* antes e após terem passado pelo *kindling* audiogênico (n=10 por grupo). \*\*\*  $p < 0,001$ . Análise estatística pelo teste ANOVA de duas vias com teste posterior de Bonferroni.

*DISCUSSÃO*

## 5. Discussão

O presente trabalho buscou avaliar um possível perfil ansiogênico da cepa WAR. Os resultados obtidos com os animais WAR ingênuos (sem qualquer estímulo acústico) no teste de conflito de Vogel não apontam alterações no comportamento dos animais da cepa, quando comparado com os animais *Wistar* ingênuos.

Essa observação contrasta com resultados previamente descritos na literatura com outros testes de ansiedade. Mais especificamente, Garcia-Cairasco e colaboradores (1998) verificaram no LCE, que os animais da cepa WAR sensíveis a crises audiogênicas, sem nenhum estímulo acústico, apresentaram um comportamento do tipo ansiogênico, representado por uma menor exploração dos braços abertos do labirinto. Adicionalmente, Oliveira e colaboradores (2005), utilizando o LTE, demonstraram um comportamento do tipo panicolítico da cepa WAR caracterizado por uma maior latência de fuga do braço aberto do labirinto. Todavia, nos dois estudos anteriormente citados foi constatado no teste do campo aberto uma menor exploração por parte dos animais WAR em relação aos animais *Wistar*. Essa alteração da atividade exploratória pode, de certa forma, ir ao encontro dos resultados obtidos, já que o teste do campo aberto, além de avaliar atividade locomotora, ainda que com parâmetros diferenciados, também é utilizado como modelo preditivo de ansiedade. (Litvin *et al.*, 2008).

Observando outros trabalhos realizados com a cepa WAR em modelos que envolvem a atividade locomotora, como o próprio teste no LTE, os animais

WAR não apresentam diferença no comportamento de esquiva inibitória em relação aos *Wistar*. (Oliveira *et al.*, 2005). Foi verificado também em testes de retenção de memória emocional, nenhuma diferença dos WAR em relação aos *Wistar*, sem passar por estímulos acústicos, na resposta de esquiva inibitória no LTE (Oliveira *et al.*, 2004) e também no *step-through passive avoidance task* (Oliveira *et al.*, 2006), podendo-se inferir que se houvesse algum déficit locomotor na cepa, ele estaria refletido nos comportamentos mensurados nesses testes.

Dessa forma, o resultado obtido no presente estudo utilizando o teste de conflito de Vogel pode ser justificado pelo fato de que diferentes testes de ansiedade avaliam diferentes parâmetros e os resultados de diferentes séries podem não ser coincidentes. (Clément *et al.*, 2009). Sudakóv e colaboradores (2013), não observaram uma correlação estatística significativa entre o LCE, campo aberto e teste de conflito de Vogel, havendo uma maior relação entre o LCE e o campo aberto e pouca relação de ambos os testes com o teste de conflito de Vogel, o que significa que animais com alta taxa de ansiedade em um teste podem demonstrar uma baixa taxa em outro. Como foi previamente observado um perfil ansiogênico nos animais WAR submetidos ao LCE, campo aberto e na latência de fuga no LTE (perfil panicolítico), é possível que no teste de conflito de Vogel esse perfil não tenha sido detectado.

Outro ponto a ser levado em conta é a distância temporal da realização dos testes anteriores, o LCE há 16 anos e o LTE há 9, em que nesse período diversas gerações de animais WAR se passaram, e portanto, o fenótipo ansiogênico desses animais pode ter se alterado com o passar das gerações,

entretanto alguns trabalhos mais recentes trazem alguns aspectos que podem corroborar que os animais WAR das gerações atuais possuem um perfil ansiogênico.

No campo das alterações hormonais, tanto o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) quanto os corticoides, atuam no Sistema Nervoso Central modulando o comportamento emocional, e a ansiedade, por sua vez, leva a mobilização do eixo HPA, aumentando os níveis de ACTH no sangue, que leva à liberação dos corticoides adrenais (Graeff, 1999), e foi verificado que a cepa WAR apresenta uma hiperatividade do eixo HPA, caracterizado por uma hiperplasia da glândula adrenal e maior liberação de corticosterona, um corticoide adrenal, em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) exógeno (Umeoka *et al.*, 2011).

Além disso, foi demonstrado também que os WAR possuem pressão arterial e frequência cardíaca elevadas (Fazan *et al.*, 2011), e para o estudo experimental, alterações fisiológicas como frequência cardíaca e pressão arterial constituem de medidas objetivas usadas para inferir o grau de ansiedade, quando aumentadas podem estar associadas a graus elevados (Graeff, 1999).

Adicionalmente, temos o comportamento de autolimpeza exacerbada denominado *hypergrooming*. A microinjeção bilateral de ocitocina na amígdala central de ratos *Wistar* provoca esse comportamento, sendo esse um modelo animal para o estudo da compulsão (Marroni *et al.*, 2007). Dessa forma foi verificado que os animais WAR quando injetados com salina realizam

*hypergrooming* equivalente aos animais *Wistar* injetados com ocitocina, e adicionalmente os WARs, sem qualquer injeção, apresentam *hypergrooming* em ambiente novo (Marroni *et al.*, 2009). Por mais que o comportamento de *grooming* esteja presente em todas as espécies animais, esse comportamento exacerbado é compulsivo e remete a muitos casos de um dos transtornos de ansiedade, o transtorno obsessivo-compulsivo, refletido nos rituais de limpeza exacerbados realizados pelos pacientes (Graeff, 1999). Portanto, esse comportamento compulsivo realizado pelos WAR pode ser em decorrência de um perfil ansiogênico endogenamente presente.

Na continuidade do estudo, consistindo na investigação dos possíveis efeitos do *kindling* audiogênico nesses animais (WAR geneticamente susceptíveis às crises audiogênicas) também no teste de conflito de Vogel, um comportamento do tipo ansiogênico foi observado em comparação com animais *Wistar*, e não havendo diferença significativa na ingestão de água durante a sessão treino dos animais, pode-se confirmar que a diferença observada não foi consequência de uma alteração na ingestão de água basal da cepa, mas sim de um comportamento ansiogênico.

Sabe-se que a ansiedade patológica, assim como demais transtornos psiquiátricos, pode depender não apenas de uma predisposição genética, mas de uma interação dessa predisposição com fatores ambientais precipitantes (Graeff, 1999). Portanto, esse comportamento dos animais WAR pode ter sido observado em decorrência de que, durante o *kindling* audiogênico, crises epiléticas tônico-clônicas são induzidas em animais susceptíveis e o estímulo acústico crônico faz com que as regiões do mesencéfalo, como colículo inferior

e colículo superior, aumentem suas conexões para circuitos do córtex, hipocampo e amígdala, levando ao surgimento de crises límbicas (Garcia-Cairasco *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 2000; Garcia-Cairasco, 2002; Romcy-Pereira & Garcia-Cairasco, 2003). Isso foi possível de ser observado nos animais pelos índices de gravidade de crises límbicas significativamente maiores nos ratos da cepa WAR do que nos ratos *Wistar*, além dos índices de crises mesencefálicas também maiores e as latências para primeira corrida significativamente menores nos ratos WAR em comparação aos *Wistar* que apresentaram resposta à estimulação acústica, apesar dos índices das crises tanto mesencefálicas quanto límbicas não apresentarem diferença significativa entre os estímulos, característica peculiar do grupo estudado.

O *kindling* audiogênico, então, pode ter atuado nos animais WAR como um fator precipitante do comportamento ansiogênico, interagindo com a possível predisposição observada nos outros testes de ansiedade (LCE, LTE e campo aberto), mais especificamente pela ativação das áreas do sistema límbico, como amígdala e hipocampo. É bem descrito na literatura que a amígdala possui um papel no comportamento da ansiedade (Graeff *et al.*, 1993a), e levando em conta que as raízes biológicas da ansiedade se encontram nas reações de defesa dos animais, no nível de perigo potencial destaca-se grande envolvimento do sistema septo-hipocampal e da amígdala, que atuam aumentando o nível de vigilância, dirigindo a atenção do animal e levando às reações as fontes de perigo (Graeff, 1999).

Adicionalmente, trabalhos de microinjeção de drogas ansiolíticas evidenciam a participação da amígdala (Liu & Glowa, 2000; Möller *et al.*, 2002;

de Andrade Strauss *et al.*, 2013) e também do hipocampo (Campos *et al.*, 2010; Nikiforuk *et al.*, 2011) na mediação do comportamento de animais no teste de conflito de Vogel. Essas informações, então, reforçam que podemos supor que o surgimento do comportamento ansiogênico nos animais WAR após o *kindling* audiogênico, possa estar relacionado com uma maior ativação dessas áreas.

Apesar dos animais que passaram pelo *kindling* audiogênico terem sido previamente expostos ao teste de conflito de Vogel e, além disso, os núcleos ativados durante o *kindling* audiogênico estão envolvidos também em mecanismos de memória, em especial a amígdala, que tem um importante papel na aquisição e expressão de memória emocional (LeDoux, 1992; Maren, 2001), além de termos dado um janelas de tempo de 37 dias entre um teste e outro, testes de retenção de memória emocional feitos com ratos WAR não mostraram diferença na resposta de esquiva inibitória no LTE (Oliveira *et al.*, 2004) e também no *step-through passive avoidance task* (Oliveira *et al.*, 2006) após estimulação acústica crônica (*kindling* audiogênico) em relação a ratos *Wistar*, portanto é provável que o comportamento ansiogênico observado seja devido ao *kindling* audiogênico e não à reexposição.

Em suma, portanto, os animais da cepa WAR, sem receber nenhum estímulo acústico, no teste de conflito de Vogel não apresentaram comportamento do tipo ansiogênico como elucidado em outros testes preditivos de ansiedade; porém após terem crises induzidas pelo *kindling* audiogênico, onde há ativação de áreas do sistema límbico, um comportamento do tipo ansiogênico passou a ser observado nesses animais.

*CONCLUSÕES*

## 6. Conclusões

Com os resultados obtidos, temos que os animais WAR, endogenamente, podem apresentar um perfil ansiogênico em relação aos animais *Wistar*, já que uma diferença de comportamento é notada em trabalhos anteriores feitos com a cepa em modelos preditivos de ansiedade, porém esse perfil não foi detectado no teste de conflito de Vogel no presente trabalho. Em contrapartida, foi possível observar que após passarem pelo *kindling* audiogênico no qual crises epiléticas são induzidas, o perfil ansiogênico passa a ser observado nos animais da cepa, sugerindo assim que as áreas recrutadas durante o protocolo, córtex, hipocampo e amígdala, podem levar ao surgimento desse tipo de comportamento.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 7. Referências Bibliográficas

Blanchard DC, Griebel G, Pobbe R, Blanchard RJ. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(4):991-998, 2011

Brandt C, Schoendienst M, Trentowska M, May TW, Pohlmann-Eden B, Tuschen-Caffier B, Schrecke M, Fueratsch N, Witte-Boelt K, Ebner A. Prevalence of Anxiety Disorders in Patients With Refractory Focal Epilepsy—A Prospective Clinic Based Survey. *Epilepsy Behav* 2010;17:259–263.

Campos AC, Ferreira FR, Guimarães FS, Lemos JI. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience* 167 (2010) 238 –246

Choi-Kwon S, Chung C, Kim H, Lee S, Yoon S, Kho H, Oh J, Lee J. Factors affecting the quality of life in patients with epilepsy in Seoul, South Korea. *Acta Neurologica Scandinavica* 2003; 108:428.

Clément Y, Le Guisquet AM, Venault P, Chapouthier G, Belzung C. Pharmacological alterations of anxious behaviour in mice depending on both strain and the behavioural situation. *PLoS One*. 2009 Nov 11;4(11):e7745

de Andrade Strauss CV, et al. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. *Behav Brain Res* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.005>

Deakin JWF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 1991; 5:305 – 15.

Doretto MC, Cortes-de-Oliveira, JA, Rossetti F, Garcia-Cairasco N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. *Epilepsia*, 50(12):2563–2574, 2009

Doretto MC, Fonseca CG, Lôbo RB, Terra VC, Oliveira JAC, Garcia-Cairasco N. Quantitative Study of the Response to Genetic Selection of the Wistar Audiogenic Rat Strain (WAR). *Behavior Genetics*. 2003; 33(1):33-42

Engel JR J. Concepts of epilepsy. *Epilepsia*. v. 36, n. suppl-1, p. S23-S29, 1995.

Fazan Jr. R, Oliveira M, Oliveira JAC, Salgado HC, Garcia Cairasco N. Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. *Epilepsy & Behavior* 22. 2011, 666–670

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy. *Epilepsia*. 2005; 46(4):470-2.

Gaitatzis A, Carroll K, Majeed A, Sander JW. The epidemiology of the comorbidity of epilepsy in the general population. *Epilepsia* 2004; 45: 1613–22.

Garcia-Cairasco N, Oliveira JA, Wakamatsu H, Bueno ST, Guimarães FS. Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. *Physiol Behav*. 1998 Jul; 64(5):671-4.

Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JA, Gomes EL, Del Bel EA, Mello LE. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res.*, v. 26, n. 1, p. 177-92, dec, 1996

Garcia-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear Res*. v. 168, n. 1-2, p. 208-22, jun, 2002.

Gilliam F, Hecimovic H, Shelinea Y. Psychiatric comorbidity, health, and function in epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 4. 2003, S26–S30

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi Jr. H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23. 1998, 237–246

Graeff FG, Silveira MCL, Nogueira RL, Audi EA, de Oliveira RMW. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.* 58:123-131; 1993.

Graeff FG, Viana M, Tomaz C. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: Effect of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26:1–4; 1993.

Graeff FG. Ansiedade. In: Graeff FG, Brandão ML (Ed). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5.ed. São Paulo: Lemos, 1999. p.135-178.

Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 239–259. 2004

Griebel G, Blanchard DC, Jung A, Lee JC, Masuda CK, Blanchard RJ. Further evidence that the mouse defense test battery is useful for screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprazolam. *Neuropharmacology* 34, 1625–1633. 1995

Jones NC, Salzberg MR, Kumar G, Couper A, Morris JM, Terence J. O'Brien TJ. Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Experimental Neurology* 209 (2008) 254–260

Kanner AM. Anxiety Disorders in Epilepsy: The Forgotten Psychiatric Comorbidity. *Epilepsy Currents*, Vol. 11, No. 3 (May/June) 2011 pp. 90–91

LeDoux JE. Emotion and the amygdala. In: *The Amygdala*. 1992. pp. 339-351, ed. J. P. Aggleton. Wiley-Liss.

Litvin Y, Pentkowski N, Pobbe RLH, Blanchard DC, Blanchard RJ. Unconditioned models of fear and anxiety. In: Robert Blanchard; D. Blanchard;

Guy Griebel; David Nutt. (Org.). Handbook of fear and anxiety. : Elsevier, 2008, v. 17, p. 81-89.

Liu M, Glowa JR. Regulation of benzodiazepine receptor binding and GABA subunit A mRNA expression by punishment and acute alprazolam administration. *Brain Research* 887 (2000) 23–33

Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001.24:897–931.

Marescaux CM, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis G, Micheletti G, Warter JM. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study, *Exp. Neurol.*, 97 (1987) 160-168.

Marroni S, Santos JC, Nakano FN, Garcia-Cairasco N. Oxytocin-induced hypergrooming in the wistar audiogenic rat (war) strain: modeling compulsion and epilepsy co-morbidities. American Epilepsy Society, 2009, Boston, EUA.

Marroni SS, Nakano FN, Gati CD, Oliveira JA, Antunes-Rodrigues J, Garcia-Cairasco N. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. *Mol Psychiatry.* 2007 Dec;12(12):1103-17.

Möller C, Sommer W, Thorsell A, Rimondini R, Heilig M. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 26 (2002) 119–122

Moraes MF, Galvis-Alonso OY, Garcia-Cairasco N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res*, 39 (2000), pp. 251–259

Naritoku DK, Mecozzi LB, Aiello MT, Faingold CL. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp. Neurol.* 1992.115, 317–324.

Nikiforuk A, Kos T, Wesolowska A. The 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology* (2011) 217:411–418

Oliveira JAC, Bortoli VC, Zangrossi H, Garcia-Cairasco N. Análise do comportamento de ratos da cepa WAR (Wistar Audiogenic Rats) no Labirinto em T Elevado. In: 20 FESBE 2005, 2005, Águas de Lindóia. *Anais do 20 FESBE 2005*. v. 1. p. 96.

Oliveira JAC, Bortoli VC, Zangrossi H, Garcia-Cairasco N. Efeitos de crises audiogênicas agudas e crônicas em ratos da cepa WAR (Wistar Audiogenic Rats) sobre os processos de aprendizagem e memória. In: XXIX Congresso Brasileiro de Epilepsia, 2004, Ribeirão Preto. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 2004. v. 10. p. 20.

Oliveira JAC, Bortoli VC, Zangrossi Jr H, Garcia-Cairasco N. Effects of acute and chronic audiogenic seizures in Wistar Audiogenic Rats (WAR Strain) on step through passive avoidance task. In: 41st Congress of the Brazilian Physiological Society & Joint Meeting with the Physiological Society, 2006, Ribeirão Preto. *Anais of the 41st Congress of the Brazilian Physiological Society & Joint Meeting with the Physiological Society*.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14:149–167; 1985.

Pinel JP, Rovner LI. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol*. 1978 Jan 15;58(2):190-202.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972 Mar;32(3):281-94.

Romcy-Pereira RN, Garcia-Cairasco N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. *Neuroscience*. 2003; 119(2):533-46.

Rossetti F, Rodrigues MC, de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 2006 Dec;72(2-3):192-208

Shneker BF, Fountain NB. *Epilepsy. Dis Mon.* 2003 Jul; 49(7):426-78.

Sudakov SK, Nazarova GA, Alekseeva EV, Bashkatova VG. Estimation of the Level of Anxiety in Rats: Differences in Results of Open-Field Test, Elevated Plus-Maze Test, and Vogel's Conflict Test. *Bull Exp Biol Med.* 2013 Jul;155(3):295-7.

Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jetté N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: A population-based analysis. *Epilepsia.* 2007;48:2336–2344.

Umeoka EH, Garcia SGB, Antunes-Rodrigues J, Elias LL, Garcia-Cairasco N. Functional characterization of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Research* 1381. 2011, 141-147.

Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 1971, 21:1–7.