

Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre

T. C. Goes, F. D. Antunes, T. H. Almeida-Souza, F. R. C. Ursulino, F. B. Garcez,

A. L. L. Melo, F. Teixeira-Silva

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

tiagofarmaufs@yahoo.com.br

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

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

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

Behavior of Wistar rats in the free-exploratory paradigm

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

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

1. INTRODUÇÃO

No campo de pesquisa da ansiedade, os modelos animais têm sido utilizados com duas finalidades: 1) avaliação de novas drogas com potencial efeito ansiolítico; e 2) estudo dos mecanismos subjacentes envolvidos no comportamento emocional [1-3].

Atualmente, há vários modelos animais de ansiedade, entretanto, eles podem não avaliar o mesmo estado psicofisiológico, já que a ansiedade não é um fenômeno unitário [4], o que pode ser evidenciado pela heterogeneidade dos transtornos ansiosos descritos no DSM-IV-R [5]. Além disso, no estudo da ansiedade encontramos dois conceitos distintos, a ansiedade-estado e a ansiedade-traço. A primeira refere-se a um estado emocional transitório, caracterizado por sentimentos subjetivos de tensão que podem variar em intensidade ao longo do tempo. Já a

segunda refere-se a uma disposição pessoal a responder com ansiedade a situações estressantes e a uma tendência a perceber um maior número de situações como ameaçadoras, sendo relativamente estável [6]. Aqui, vale destacar que a ansiedade-traço é uma importante característica dos pacientes com transtornos de ansiedade, os quais apresentam maior traço ansioso quando comparados a indivíduos saudáveis [7].

Muitos modelos de ansiedade confrontam os animais com situações eliciadoras desta emoção, como a administração de substâncias ansiogênicas (yoimbina, cafeína e β -carbolicinas), os testes de conflito (labirinto em cruz elevado e caixa de transição claro/escuro), ou exposição a um estímulo aversivo (enterrar defensivo) [3], modelando assim a ansiedade-estado.

O uso de modelos animais de ansiedade-estado, embora prático e conveniente, pode apresentar algumas limitações. Por exemplo, na procura por novos ansiolíticos, uma droga capaz de reduzir ou prevenir a ansiedade induzida em um animal pode ter o mesmo efeito no estado ansioso de humanos, mas talvez não seja eficaz na redução da ansiedade de pacientes com alto traço ansioso, haja visto que os substratos neurais da ansiedade-estado e da ansiedade-traço podem não ser os mesmos [4]. Tem sido demonstrado que as respostas de ansiedade frente a um estímulo ameaçador envolvem estruturas encefálicas do Sistema de Inibição Comportamental, tais como amígdala, septo, hipocampo, núcleo mediano da rafe, substância cinzenta periaquedutal ventral e locus ceruleus [8,9], enquanto o perfil ansioso estaria relacionado ao córtex orbitofrontal [10,11].

O paradigma da exploração livre (PEL) tem sido proposto como um modelo de ansiedade-traço [12,13]. Esse paradigma foi descrito inicialmente por Hughes [14,15], que demonstrou que quando ratos tinham a oportunidade de se movimentar livremente em ambientes familiares e não familiares, apresentados simultaneamente, frequentemente exibiam preferência pelo ambiente novo. Griebel e colaboradores [12] então sugeriram que essa situação de exploração livre poderia ser utilizada para se testar o grau de ansiedade-traço de roedores, e demonstraram que indivíduos de perfil mais ansioso tendiam a explorar menos os ambientes não familiares, quando comparados a indivíduos com menor disposição à ansiedade. Há também algumas evidências que mostram que não há alteração do estado ansioso durante a realização do teste. Por exemplo, Misslin e colaboradores [16,17] observaram que camundongos Swiss não apresentavam sinais fisiológicos de medo, a não ser que fossem forçados a entrar no ambiente novo. Além disto, Belzung e Le Pape [18], usando análise fatorial, demonstraram que as variáveis avaliadas no PEL não eram descritas pelos mesmos fatores que as variáveis avaliadas em modelos onde os animais são forçados a entrar num ambiente novo. Também, em nosso laboratório, uma recente avaliação da confiabilidade teste/reteste do PEL foi realizada, confirmando a estabilidade temporal desse modelo [13], condição *sine qua non* para um modelo de traço de personalidade.

Considerados como um todo, estes dados levam a crer que o PEL seja mesmo um modelo animal de ansiedade-traço e, portanto, um modelo de escolha para categorizar os animais de acordo com o seu perfil ansioso. O processo de categorização é uma ferramenta muito útil, especialmente nos casos em que não se dispõe de linhagens isogênicas de roedores muito ou pouco ansiosos. Dessa forma, torna-se de interesse científico o conhecimento do comportamento, no PEL, de roedores das linhagens heterogênicas mais utilizadas no campo da pesquisa com ansiedade.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi descrever os parâmetros comportamentais de ratos Wistar, machos, no PEL. Com base nesta descrição, estudos futuros poderão categorizar seus animais de acordo com o nível de ansiedade, utilizando o padrão de classificação usual, que tem como base a média \pm 1 DP [19], ou o intervalo interquartil [20], ou qualquer outro tipo de classificação arbitrária como, por exemplo, média \pm 3 EPM [21].

2. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados trezentos e sessenta ratos Wistar machos, adultos (2 – 3 meses de idade), pesando entre 270 e 350 gramas, oriundos do biotério do Laboratório de Fisiologia do Comportamento da Universidade Federal de Sergipe, mantidos em no máximo 5 animais por gaiola de polipropileno (410 x 340 x 175mm) com tampa de metal e forrada com maravalha de pinus, com livre acesso à água filtrada e ração (Purina), numa sala de temperatura controlada em torno de 24°C, com exaustão de ar e ciclo claro/escuro de 12h.

O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Sergipe.

2.2. Paradigma da Exploração Livre

O modelo foi configurado conforme descrito por Antunes e colaboradores [22].

O aparato consiste de uma caixa de madeira, dividida em duas partes, sendo que cada parte se subdivide em três unidades exploratórias de 20 x 20 cm. As duas metades são separadas por uma divisória removível, e o chão é coberto por zeólitas (Zoocel Biotério®, Celta Brasil). Aproximadamente 24h antes do teste, um animal é colocado em uma das metades da caixa, com livre acesso à água e comida, e lá permanece até o momento do teste, a fim de se familiarizar com o ambiente. No dia do teste, a divisória entre o ambiente familiar e o novo é removida, e o animal é observado por 15 minutos sob luz infravermelha. Este modelo se baseia no fato de que quando roedores têm a oportunidade de se mover livremente entre um ambiente novo e um familiar, frequentemente exibem forte tendência de aproximação em relação à novidade, estabelecendo um conflito entre a curiosidade e a neofobia. Diz-se que a ansiedade é menor, quanto maior a exploração do ambiente novo [12,13].

2.3. Procedimento

Os animais foram submetidos ao PEL conforme descrito acima. Durante os 15 minutos de observação, foram registrados: o tempo gasto em cada um dos ambientes, o tempo em “rearing” (comportamento de levantar sobre as patas traseiras), as tentativas de aproximação do ambiente novo (colocar o nariz ou as patas dianteiras no espaço novo, retornando imediatamente ao ambiente familiar) e a distância total percorrida no aparato.

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

O teste foi realizado na fase escura do ciclo claro/escuro, entre 18 e 19 horas e os parâmetros comportamentais foram medidos através de um sistema computadorizado de rastreamento de animais - Anymaze© (Stoelting Co., USA).

2.4. Análises Estatísticas

O tempo gasto no ambiente novo, o tempo em “rearing” no ambiente novo e a distância percorrida no ambiente novo foram calculados, para cada animal, como porcentagem do tempo total do teste, do tempo total em “rearing” e da distância total percorrida, respectivamente. Assim, foram analisados os seguintes parâmetros: porcentagem de tempo no ambiente novo (%TAN); porcentagem de “rearing” no ambiente novo (%RAN); porcentagem da distância no ambiente novo (%DAN), número de tentativas de aproximação do ambiente novo (TENT) e distância total percorrida no aparato (DTP).

Para avaliar a preferência pelo ambiente novo foi realizado um teste t para uma amostra, no qual se comparou a média da %TAN, da %RAN e da %DAN a 50%.

3. RESULTADOS

Os dados dos parâmetros comportamentais estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores dos parâmetros comportamentais de ratos Wistar machos avaliados no Paradigma da Exploração Livre.

Parâmetros comportamentais	Mediana (Q ₁ – Q ₃)	Média ± DP	Média ± EPM
%TAN	69,50 (51,17 – 80,00)	62,18 ± 25,09	62,18 ± 1,32
%RAN	69,55 (53,45 – 82,34)	63,83 ± 26,23	63,83 ± 1,38
%DAN	69,06 (58,13 – 75,13)	62,69 ± 21,29	62,69 ± 1,12
TENT	0,00 (0,00 – 2,00)	1,79 ± 3,80	1,79 ± 0,20
DTP (m)	18,25 (13,97 – 22,63)	18,42 ± 7,05	18,42 ± 0,37

%TAN: porcentagem de tempo no ambiente novo; %RAN: porcentagem de “rearing” no ambiente novo; %DAN: porcentagem de distância no ambiente novo; TENT: número de tentativas de aproximação do ambiente novo; DTP: distância total percorrida no aparato; Q₁: 1º quartil; Q₃: 3º quartil; DP: desvio padrão; EPM: erro padrão da média.

Quanto à preferência pelo ambiente novo foram observados uma porcentagem de tempo no ambiente novo significativamente maior que 50% ($t= 9,208$; $p< 0,001$; Fig 1), uma porcentagem de “rearing” no ambiente novo significativamente maior que 50% ($t= 9,426$; $p< 0,001$; Fig 1) e uma porcentagem de distância no ambiente novo significativamente maior que 50% ($t= 11,105$; $p< 0,001$; Fig 1).

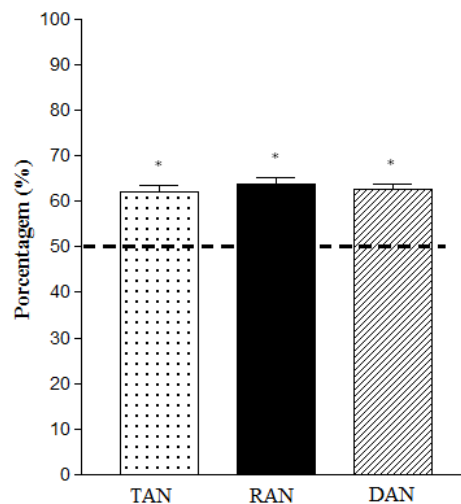


Figura 1. Porcentagem de tempo no ambiente novo (%TAN), Porcentagem de “rearing” no ambiente novo (%RAN) e Porcentagem de distância no ambiente novo (%DAN) do Paradigma da Exploração Livre. Dados expressos em média ± erro padrão da média. *Diferente de 50% ($p< 0,001$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados aqui obtidos mostraram que os animais, em média, apresentaram valores para o parâmetro distância total percorrida próximos aos já descritos em estudo anterior, para ratos

machos [22]. Este é um parâmetro de atividade locomotora que, em modelos baseados em comportamento exploratório, pode covariar com os parâmetros de ansiedade e, portanto, deve sempre ser avaliado.

O número de tentativas de aproximação do ambiente novo é uma medida relacionada à tomada de decisão. Um maior número de tentativas representa uma maior indecisão do animal, a qual reflete um maior nível de ansiedade. No presente estudo, este parâmetro também apresentou valores similares aos observados anteriormente [13].

Em relação aos parâmetros relacionados à taxa de exploração do ambiente novo, %TAN, %RAN e %DAN, foram encontrados valores significativamente maiores que 50%, confirmando a preferência dos animais pelo ambiente novo, característica do PEL [13-15]. Acredita-se que esta preferência deve-se ao fato de que, em muitas situações da vida real, os animais tendem a explorar mais os ambientes novos em comparação ao ambiente familiar [23], um comportamento denominado de curiosidade [14]. Mesmo havendo preferência pelo ambiente novo, já foi demonstrado que a novidade pode provocar nos animais reações defensivas semelhantes àquelas eliciadas por situações ameaçadoras [24]. Assim, a exposição dos animais a um ambiente familiar e a um novo, apresentados simultaneamente, gera um conflito entre a curiosidade e o medo da novidade (neofobia). Este conflito, então, pode ser utilizado para avaliar o perfil ansioso de roedores [12], de forma que, nos animais com alto traço ansioso, a neofobia supera a curiosidade e nos animais com baixo traço ansioso a curiosidade supera a neofobia.

Algumas linhagens isogênicas de roedores já tem sido pré-selecionadas como sendo de alta ou baixa ansiedade-traço, como é o caso dos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, que quando expostos ao PEL, apresentam comportamentos de alto e de baixo traço ansioso, respectivamente [12]. No entanto, muitos laboratórios de pesquisa não dispõem destas linhagens. Assim, pesquisadores selecionam, a partir de linhagens heterogênicas, indivíduos com diferentes níveis de ansiedade [20,21, 25,26], a fim de minimizar os vieses decorrentes da heterogeneidade, já que a eficácia de drogas ansiolíticas não é frequentemente evidenciada em uma população de sujeitos normais, mas sim em uma população ansiosa [4].

Neste tipo de abordagem seletiva, o padrão usual de classificação tem como base a média (M) \pm um desvio padrão (DP) [19], ou outro tipo de classificação arbitrária também baseada em valores estatísticos descritivos, como o intervalo interquartil [20] ou a média \pm três erros padrão da média (EPM) [21]. Assim, escolhe-se um parâmetro de um determinado modelo de ansiedade e, com base nos valores individuais (v) apresentados, cada animal é classificado como de alta ansiedade ($v < M - 1 DP$, ou $v < 1^{\circ}$ Quartil, ou $v < M - 3 EPM$), baixa ansiedade ($v > M + 1 DP$, ou $v > 3^{\circ}$ Quartil, ou $v > M + 3 EPM$), ou média ansiedade (todos os demais).

Na grande maioria dos estudos, os processos de seleção têm-se utilizado de modelos não estáveis ao longo do tempo [19], como é o caso do Labirinto em Cruz Elevado, um modelo de ansiedade-estado [21,26]. O problema é que este tipo de modelo pode levar a uma variação dos resultados a depender de quando o experimento seja realizado, o que pode comprometer o processo de seleção dos animais [19].

Uma alternativa já vem sendo praticada por alguns autores [25,27] que é a exposição dos animais a diferentes modelos de ansiedade-estado, em diferentes momentos. De modo que, somente os indivíduos que apresentem a mesma característica em dois ou mais modelos são selecionados. No entanto, um número muito grande de indivíduos acaba sendo excluído do estudo, o que representa uma grande desvantagem deste método de seleção.

Neste contexto, o PEL parece ser a melhor opção para a seleção dos animais, pois além de os indivíduos serem expostos a somente uma situação, evitando a interferência de um modelo no outro, um menor número de animais é requerido [28]. Não obstante, este número ainda pode ser reduzido e, isto é possível, quando se conhece previamente os valores dos parâmetros comportamentais dos animais nesse modelo, o que dispensa a exposição de animais apenas para obtenção de valores estatísticos descritivos como, por exemplo, média e desvio padrão.

Diante disto, a seleção dos animais de acordo com o perfil ansioso pode ser realizada utilizando os valores aqui obtidos da %TAN, pois é o único parâmetro no PEL, para ratos Wistar, machos, que se mostrou estável ao longo do tempo [13], sendo a estabilidade temporal

um fator indispensável para a avaliação do traço ansioso [6]. De tal modo, com uma única passagem pelo PEL, utilizando-se, por exemplo, o padrão usual de classificação, poder-se-ia considerar como de alta ansiedade, animais com %TAN < 37,09, como de baixa ansiedade, animais com %TAN > 87,27; e como de média ansiedade, animais com %TAN entre estes valores.

Nos casos em que o pesquisador, por alguma razão, optar por não selecionar os animais de acordo com o perfil ansioso, mas de acordo com a ansiedade apresentada no momento, pode-se lançar mão dos valores aqui obtidos da %RAN, %DAN e TENT. Aqui vale destacar, que para TENT o padrão usual de classificação não pode ser adotado, pois este parâmetro apresenta um valor de desvio padrão maior que a média, de forma que o cálculo levaria a um número negativo de tentativas para os animais de baixa ansiedade.

Cabe destacar aqui, que a amostra aqui utilizada é representativa da população, com erro menor que 10%, calculado a partir da fórmula para determinação de tamanho amostral [29], na qual se utilizou a prevalência para os transtornos ansiosos (18,1%) observada em estudo de Kessler e colaboradores [30].

5. CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos descrevem os parâmetros comportamentais de ratos Wistar machos no PEL e, são de grande valia para futuros estudos no campo da ansiedade que pretendam selecionar previamente estes animais de acordo com o seu perfil ansioso.

-
1. Barret JE. Recent developments in animal models of anxiety and anxiolytic drugs. In: Langer S, Mendlewicz J, Racagni G, editors. Target receptors for anxiolytics and hypnotics: from molecular pharmacology to therapeutics. Int. Acad. for Biomed. Drug Res. Switzerland: S. Karger, Basel; 1992, p. 24-33.
 2. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30:289-304.
 3. Martin P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. *Acta Psychiatr Scand.* 1998; 98 (393 Suppl):74-80.
 4. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac Ther.* 1990, 46:321-40.
 5. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais. 4ª ed rev (DSM-IV-R). Porto Alegre: Artmed; 2002.
 6. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE. Manual for the state-trait anxiety inventory (“self-evaluation questionnaire”). California: Consulting Psychologists Press; 1970.
 7. Kennedy BL, Schwab JJ, Morris RL, Beldia G. Assessment of state and trait anxiety in subjects with anxiety and depressive disorders. *Psychiatr Q.* 2001; 72:263-76.
 8. Gray J.A, Mcnaughton N. The neuropsychology of anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. 424p.
 9. Graeff FG, Hetem LAB. *Neurobiologia.* Atheneu: Rio de Janeiro; 2004. Transtornos de Ansiedade; p.107-132.
 10. Blackmon K, Barr WB, Carlson C, Devinsky O, Dubois J, Pogash D, Quinn BT, Kuzniecky R, Halgren E, Thesen T. Structural evidence for involvement of a left amygdala-orbitofrontal network in subclinical anxiety. *Psychiatry Res.* 2011; 30:296-303.
 11. Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ. Role of the primate orbitofrontal cortex in mediating anxious temperament. *Biol Psychiatry.* 2007; 62:1134-1139.
 12. Griebel G, Belzung C, Misslin R, Vogel E. The free exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potencial neophobia reducing drugs. *Behav Pharmacol.* 1993; 4:637-44.
 13. Teixeira-Silva F, Antunes FD, Silva PRS, Goes TC, Dantas EC, Santiago MF, Andrade RM. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in rats: test-retest reliability. *Physiol Behav.* 2009; 96:729-34.
 14. Hughes RN. Food deprivation and locomotor exploration in the white rat. *Anim Behav.* 1965; 13:30-2.

15. Hughes RN. Behaviour of male and female rats with free choice of two environments differing in novelty. *Anim Behav.* 1968; 16:92-6.
16. Misslin R, Herzog F, Koch B, Ropartz P. Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse. *Psychoneuroendocrinology.* 1982; 7:217-21.
17. Misslin R, Cigrang M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? *Behav Processes.* 1986; 12:45-50.
18. Belzung C, Le Pape G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol Behav.* 1994; 56:623-8.
19. Andreatini R, Bacellar LFS. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2000; 24:549-60.
20. Matos AC, Teixeira-Silva F, Goes TC, Quintans Jr LJ, Albuquerque RL Jr, Bonjardim LR. Trait anxiety affects the orofacial nociceptive response in rats. *Biol Res.* 2011; 44:357-61.
21. Blatt SL, Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:457-61.
22. Antunes FD, Goes TC, Vígaro MG, Teixeira-Silva F. Automation of the free-exploratory paradigm. *J Neurosci Methods.* 2011; 197:216-20.
23. Hughes RN. Intrinsic exploration in animals: motives and measurement. *Behav Processes.* 1997; 41:213-26.
24. Blanchard RJ, Kelley MJ, Blanchard DC. Defensive reactions and exploratory behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1974; 87:1129-33.
25. Do-Rego JC, Viana AF, Le Maitre E, Daniel A, Rates SMK, Leroux-Nicollet I, Costentin J. Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. *Behav Brain Res.* 2006; 169:282-8.
26. Ribeiro RL, Andreatini R, Wolfman C, Viola H, Medina JH, Da Cunha C. The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiol Learn Mem.* 1999; 72:78-94.
27. Vautrin S, Pelloux Y, Costentin J. Preference for caffeine appears earlier in non-anxious than in anxious mice. *Neurosci Lett.* 2005; 386:94-8.
28. Goes TC, Antunes FD, Teixeira-Silva F. Trait and state anxiety in animal models: Is there correlation?. *Neurosci Lett.* 2009; 450:266-9.
29. Luiz RR, Magnanini MMF. O tamanho da amostra em investigações epidemiológicas. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, organizadores. *Epidemiologia.* São Paulo: Atheneu; 2002, p. 415-27.
30. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 2005; 62:617-27.