

JOSIMARÍ CRISTIANE TIEMANN ARAÚJO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BUPRENORFINA E FLUOXETINA NA MANIFESTAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE
GENERALIZADA E COM O PÂNICO, NO LABIRINTO EM T ELEVADO**

ASSIS

2018

JOSIMARÍ CRISTIANE TIEMANN ARAÚJO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BUPRENORFINA E FLUOXETINA NA MANIFESTAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE
GENERALIZADA E COM O PÂNICO, NO LABIRINTO EM T ELEVADO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e
Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual
Paulista para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia (Área de Conhecimento: Caracterização
da Diversidade Biológica)

Orientadora: Profa. Dra. Telma Gonçalves Carneiro
Spera de Andrade

ASSIS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

T562i Tiemann-Araújo, Josimarí Cristiane
Associação entre buprenorfina e fluoxetina na manifestação de
comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade
generalizada e com o pânico, no Labirinto em T Elevado/
Josimarí Cristiane Tiemann-Araújo. Assis, 2018.
92 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dra. Telma Gonçalves C. Spera de Andrade

1. Opióides. 2. Serotonina. 3. Fármacos. 4. Ansiedade. 5.
Síndrome do pânico. I. Título.

CDD 615.1



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ASSOCIAÇÃO ENTRE BUPRENORFINA E FLUOXETINA NA MANIFESTAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O PÂNICO

AUTORA: JOSIMARÍ CRISTIANE TIEMANN ARAÚJO

ORIENTADORA: TELMA GONÇALVES CARNEIRO SPERA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS, área: CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TELMA GONÇALVES CARNEIRO SPERA DE ANDRADE
Depto. de Ciências Biológicas / UNESP/Assis

Profa. Dra. CÂMILA MARRONI RONCON
FEMA/ASSIS / FEMA/ASSIS

Profa. Dra. LUCINÉIA DOS SANTOS
Depto. de Biotecnologia / UNESP/Assis

Assis, 04 de junho de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são a plenitude do sucesso, aos quais faço com reais e sinceros sentimentos deixando cravados nessas linhas que serão immortalizadas a partir deste momento, grafadas aqui e no coração de quem as lê.

Agradeço ao soberano e poderoso Deus por ter me conduzido nesse caminho e ter me proporcionado crescimento intelectual, força emocional e física para concluir essa etapa de minha vida.

Ao corpo docente que fazem parte desta instituição de ensino UNESP, que repartiu seus conhecimentos em Biociências para me trazer uma nova realidade profissional, bem como aos funcionários, que em todo tempo estiveram dispostos a prestar seus serviços para o bom andamento deste trabalho.

Agradecimento especial a minha estimada e admirável orientadora Prof^a Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade, mulher guerreira, de grande caráter, cuidado pelos seus ideais, por seu acolhimento e cuidado para comigo nesses anos e por me ensinar que sou forte e corajosa.

Agradeço a disposição dos professores da banca de avaliação: Prof^a Dra. Camila Marroni Roncon, Prof^a Dra. Lucinéia dos Santos, Prof^a Dra. Valéria Marta Gomes de Lima a qual reverencio gratidão por sua disposição em nos abrir as portas de seu laboratório para a realização do seguimento dessa linha de pesquisa, sem a qual não teríamos êxito.

Aos meus familiares que não me abandonaram, esposo Paulo Neves de Araújo que sempre me apoiou e nunca me deixou desanimar, aos meus preciosos, filhos Amanda Tiemann Araújo, exemplo de filha, que me auxiliou como uma leoa me acolhendo com sua mão de gratidão com um jantar após um dia exaustivo, Asafe Abner, meu amado e paciente filho, que sempre depositou palavras de força e ânimo para derrotar os obstáculos, ao meu caçula Álefe Álec, persistente homenzinho, que com seu jeito altivo me fez enxergar muitas coisas a fim de enfrentar essa batalha. A minha amada e graciosa mãe, que esteve sempre comigo, com suas palavras e orações, mulher honrada, mulher de Deus, a minha irmã que também me sustentou com orações, me encorajando a chegar até final, de cabeça erguida e coração alegre.

Aos amigos queridos deste laboratório, Ariela, Paloma, Mariane, Maria Eulália, que sempre me estenderam a mão e aos quais eu devo imensurável gratidão por compartilhar comigo parte deste trabalho por eles realizado, para que eu pudesse alcançar essa meta. Ao Matheus, Sérgio, Marina e Victor que também contribuíram para minha evolução.

Ao querido e estimado amigo Bioterista Flávio Moises que esteve desde sua chegada ao meu lado, oferecendo ombro amigo e seus chás orientais para aliviar a ansiedade natural e diária. À médica veterinária Dra. Fernanda Zandonadi pelo amparo e cuidado com nossos animais nesse laboratório.

Também a minha amiga estimada, Mariane Neves, psicóloga em formação, amiga, irmã, que se tornou minha parceira de todos os momentos, um ser humano incrível.

E aos meus queridos amigos pessoais, que não estiveram aqui de corpo presente, porém sempre me conduziram em amor, me estimulando a perseverar com palavras e muito aconchego.

Meus sinceros agradecimentos.

TIEMANN-ARAÚJO, Josimarí Cristiane. **Associação entre buprenorfina e fluoxetina na manifestação de comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico, no labirinto em T elevado.** 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2018.

RESUMO

Fármacos antidepressivos como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina são utilizados no tratamento da ansiedade, pânico e outros transtornos mentais. Os efeitos desejados ocorrem somente após administração crônica, em torno de 3 a 4 semanas após o início do tratamento, com aumento dos sintomas de ansiedade no início da terapia farmacológica, ocasionando a descontinuidade do uso desses fármacos. Além disso, há relatos de resistência a esse tipo de tratamento. Visando encontrar soluções para tais problemas, fundamentados em estudos que mostraram que mecanismos opioides favorecem a atividade inibitória da serotonina em neurônios da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal que modulam a fuga/pânico, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito da Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide, como agente ansiolítico e anti-pânico, como também avaliar se o efeito ansiolítico e antipânico da Fluoxetina seriam antecipados pela associação com a Buprenorfina. Foram realizados 3 experimentos utilizando ratos machos *Wistar* com peso médio de 200g no início das sessões experimentais: 1. Tratamento agudo com Buprenorfina IP nas doses (0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg), tendo como controle positivo o Alprazolam IP (4mg/Kg); 2. Tratamento subcrônico 3 dias com Buprenorfina IP (0,3mg/Kg); 3. Tratamento agudo com Buprenorfina (0,3mg/Kg) - associado ao tratamento subcrônico com Fluoxetina 3 dias IP (10mg/Kg). Após os tratamentos, os animais foram submetidos à avaliação comportamental no Labirinto em T Elevado (LTE) e, subsequentemente, ao Campo Aberto e ao Teste de Transição Claro-Escuro. No experimento 1 o teste comportamental foi repetido 24 horas após a primeira avaliação comportamental. Os resultados mostraram que a Buprenorfina nas doses maiores diminuiu a latência das esquivas, sem alteração das fugas no LTE, diferentemente do que se constatou no tratamento agudo com o Alprazolam, o qual diminuiu também as esquivas, mas aumentou a latência nas fugas, efeitos esses

interpretados respectivamente como, ansiolítico e panicolítico. Vinte e quatro horas depois não se constatou mais efeito do Alprazolam, e o efeito da Buprenorfina sobre as esquivas só foi identificado na maior dose e apenas na LB. Em nenhuma das duas situações houve aumento de atividade motora. No teste de Transição Claro-Escuro não se constatou efeito expressivo nas condições estudadas, apenas possibilitou a escolha da maior dose para a continuidade do estudo, já que a intermediária aumentou a atividade motora nesse teste 24h após a injeção. A Buprenorfina administrada subcronicamente também diminuiu as esquivas, sem afetar a latência das fugas e o comportamento motor no campo aberto. Também não se identificou alterações no Teste de Transição Claro-escuro. A Buprenorfina antecipou o efeito ansiolítico da Fluoxetina, sem afetar as respostas relacionadas com a manifestação do pânico. Entretanto não houve confirmação dos achados no outro teste de ansiedade. Conclui-se que a Buprenorfina, administrada de forma aguda e subcrônica, diminuiu os comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada, e antecipou o efeito ansiolítico da Fluoxetina, podendo se constituir em uma opção relevante no tratamento dos transtornos de ansiedade na clínica, devido à sua baixa capacidade de causar efeitos adversos e também diante da possibilidade de antecipar os efeitos benéficos da fluoxetina, apenas com uma injeção.

Palavras-chave: Buprenorfina. Fluoxetina. Labirinto em T Elevado. Receptores opioides. Transtorno de Ansiedade Generalizada. Transtorno do Pânico.

TIEMANN-ARAÚJO, Josimarí Cristiane. **Association between buprenorphine and fluoxetine in the manifestation of the defensive behaviors related to generalized anxiety and panic, in the elevated T maze.** 2018. 92 p. Master's dissertation (Bioscience) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2018.

ABSTRACT

Antidepressant drugs such as selective serotonin reuptake inhibitors are used in the treatment of anxiety, panic and other mental disorders. The desired effects occur only after chronic administration, around 3 to 4 weeks after starting treatment, with increased anxiety symptoms at the beginning of pharmacological therapy, causing the discontinuation of the use of these drugs. In addition, there are reports of resistance to this type of treatment. Aiming to find solutions for such problems, based on studies that showed that opioid mechanisms favor the serotonin inhibitory activity in SCPD neurons that modulate escape/panic, the present study aimed to investigate the effect of Buprenorphine, a partial agonist of μ receptors-opioid and antagonist κ receptor-opioid as anxiolytic and anti-panic agents as well as assessing whether the anxiolytic and antipanic effect of Fluoxetine would be anticipated by association with Buprenorphine. Three experiments were performed using male Wistar rats weighing 200g at the beginning of the experimental sessions: 1. Acute treatment with Buprenorphine IP at doses (0,015mg/kg, 0,03mg /kg and 0,3mg/kg) or Alprazolam IP (4mg/kg); 2. Subchronic treatment 3 days with Buprenorphine IP (0,3mg/kg); 3. Acute treatment with Buprenorphine (0,3mg/kg) - associated to the subchronic treatment with Fluoxetine 3 days IP (10mg/kg). After the treatments, the animals were submitted to behavioral evaluation in the Elevated T Maze (ETM) and subsequently to the Open Field and the Light-Dark Transition Test. In experiment 1 the behavioral test was repeated 24 hours after the first behavioral evaluation. The results showed that Buprenorphine in the larger doses decreased the manifestation of the avoidances, without alterations of the scapes in the ETM, differently from what was observed in the acute treatment with Alprazolam, which also reduced the avoidances, but increased the latency in the scapes, results interpreted respectively as anxiolytic and panicolytic. Twenty-four hours later no effect of Alprazolam was found, and the effect of Buprenorphine on the avoidance was only identified at the highest dose and only at LB. There was no increase in motor activity in either of the two

situations. In the Light-Dark Transition Test, no significant effect was observed in the conditions studied, it only allowed the choice of the highest dose for the continuity of the study, since the intermediary increased the motor activity in this test 24 hours after the injection. Subchronic administration of Buprenorphine also decreased the avoidances without affecting the scapes and motor behavior in the open field. Also, no changes were identified in the Light-Dark Transition Test. Buprenorphine anticipated the anxiolytic effect of Fluoxetine, without affecting the responses related to the manifestation of panic. However, there was no confirmation of the findings in the other anxiety test. It was concluded that acute and subchronic administration of the Buprenorphine decreased the defensive behaviors related to generalized anxiety, and anticipated the anxiolytic effect of Fluoxetine, which may constitute a relevant option in the treatment of anxiety disorders in the clinic due to its low ability to cause adverse effects and also the possibility of anticipating the beneficial effects of Fluoxetine with an injection alone.

Keywords: Buprenorphine. Fluoxetine. Elevated T Maze. Opioid receptors. Generalized Anxiety Disorder. Panic Disorder.

“Não é a força, mas a constância dos bons resultados que conduz os homens à felicidade”.

Friedrich Nietzsche

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Labirinto em T elevado (LTE): um modelo animal que discrimina dois subtipos de ansiedade – Transtorno de Ansiedade Generalizada e Transtorno do Pânico.....	22
Figura 2	Mecanismo da neurotransmissão serotoninérgica e nor-adrenérgica central antes do tratamento.....	24
Figura 3	Mecanismo da neurotransmissão serotoninérgica e nor-adrenérgica central em decorrência do tratamento agudo.....	24
Figura 4	Mecanismo da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central no tratamento crônico.....	25
Figura 5	Mecanismo de ação de opioides sobre a proteína G.....	27

ARTIGO

Figura 1	Latências de esquivas no LTE apresentadas por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg, com reexposição 24 horas após o teste.....	51
Figura 2	Latências de fugas no LTE apresentadas por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg, com reexposição 24 horas após o teste.....	53
Figura 3	Número de quadrados percorridos no Campo Aberto por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg, com reexposição 24 horas após o teste.....	54
Figura 4	Latência para saída do lado claro no Teste de Transição Claro-Escuro com reexposição 24 horas após o teste	56
Figura 5	Número de tentativas (espreitas), de transições e de quadrados percorridos no lado claro no Teste de Transição Claro-Escuro apresentado por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg, com reexposição 24 horas após o teste.....	57

Figura 6	Latências das esquivas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento subcrônico de Buprenorfina.....	58
Figura 7	Latências das fugas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento subcrônico de Buprenorfina	59
Figura 8	Número de quadrados percorridos no Campo Aberto apresentado por animais submetidos ao tratamento subcrônico de Buprenorfina	60
Figura 9	Latência para saída do lado claro, como também de permanência no lado claro e número de tentativas (espreitas), de transições e de quadrados percorridos tratamento subcrônico de Buprenorfina.....	61
Figura 10	Latências das esquivas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento agudo com Buprenorfina 0,3mg/Kg, em associação com o tratamento subcrônico com a Fluoxetina 10mg/Kg.....	62
Figura 11	Latência das fugas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento agudo com Buprenorfina 0,3mg/Kg, em associação com o tratamento subcrônico com a Fluoxetina 10mg/Kg.....	63
Figura 12	Número de quadrados percorridos no Campo Aberto por animais submetidos ao tratamento agudo com Buprenorfina 0,3mg/Kg, em associação com o tratamento subcrônico com a Fluoxetina 10mg/Kg.....	64
Figura 13	Latência para saída do lado claro, como também de permanência no lado Claro e número de tentativas (espreita), de transições e de quadrados percorridos por animais submetidos ao tratamento agudo com Buprenorfina 0,3mg/Kg, em associação com o tratamento subcrônico com a Fluoxetina 10mg/Kg.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Opioides e sua seletividade por diferentes receptores opioides	26
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS

[3H]DPDPE	Agonista seletivo de receptores δ -opioides
5-HT	5- Hidroxitriptamina (Serotonina)
5-HIAA	5-Hidroxiindolacético
8-OH-DPAT	8-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina
ATCs	Antidepressivos tricíclicos
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CID	Código internacional das doenças
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CTOP	Antagonista seletivo de receptores μ -opioide (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂)
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DAMGO	Agonista seletivo do receptor μ -opioide D-Ala, N-MePhe e Gly encefalina
DOP	Receptor peptídico opioide delta
DNVL	Ventrolateral dorsal da rafe
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
E1	Esquiva 1
E2	Esquiva 2
EPM	Erro Padrão da Média
F	Frequência
F1	Fuga 1
F2	Fuga 2
F3	Fuga 3
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
IMAO	Inibidores de monoaminoxidase
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
IP	Intraperitoneal

IUPHAR	International Union of Pharmacologists
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LB	Linha de Base
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTE	Labirinto em T Elevado
MPS	Ministério da Previdência Social
MOP	receptor peptídico opioide mu
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
NOP	Receptor Peptídico FQ de Nociceptinasorfanina
OMS	Organização Mundial de Saúde
SCP	Substancia Cinzenta Periaqueductal
SCPD	Substância Cinzenta Periaqueductal Dorsal
SIC	Sistema de Inibição Comportamental
SNC	Sistema Nervoso Central
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
TP	Transtorno do Pânico
VMAT	Transportador de Monoaminas Vesicular
KOP	Receptor Peptídico Opioide Kappa
WAY100635	Antagonista de Receptores 5-HT _{1A}
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Epidemiologia da ansiedade.....	19
1.3 O Labirinto em T Elevado: um modelo de avaliação experimental de ansiedade	21
1.4 Psicofarmacologia da ansiedade	22
1.5 O sistema opioiédrgico e serotoninérgico e suas possíveis interações.....	25
REFERÊNCIAS	32
ARTIGO	37
ASSOCIAÇÃO ENTRE BUPRENORFINA E FLUOXETINA NA MANIFESTAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O PÂNICO, NO LABIRINTO EM T ELEVADO	37
HIGHLIGHTS	40
RESUMO	41
1. Introdução	43
2. Materiais e Métodos.....	46
2.1 Animais	46
2.2 Drogas	46
2.3 Testes comportamentais	47
2.2 Delineamento Experimental.....	49
3. Resultados	50
4. Discussão.....	66
5. Conclusões	70
6. Referências.....	70
ANEXOS	76
ANEXO I - NORMAS DA REVISTA PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR ..	76
ANEXO II - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA	92

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento dos transtornos mentais tem desafiado estudiosos da neurociência a buscar novas alternativas profiláticas e terapêuticas. Dentre os transtornos, destaca-se no presente trabalho, os transtornos de ansiedade.

A ansiedade patológica caracteriza-se por comprometer o desempenho dos indivíduos e afetar o seu cotidiano (GRAEFF, 2012). Portanto, diferencia-se da ansiedade normal por surgir de maneira inconveniente e não adaptativa, com sensação de perigo eminente sem que uma ameaça real seja identificada, e, quando existente, é considerada como desproporcional (GRAEFF, 2012).

O Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) é caracterizado por preocupações exacerbadas e persistentes, por um período de pelo menos seis meses, em conjunto com pelo menos três sintomas como, fadiga, inquietação, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular ou perturbações no sono, atingindo adultos e interferindo no rendimento de suas atividades cotidianas, já em crianças prejudicam a capacidade de concentração pertinente a cognição. O Transtorno do Pânico (TP) relaciona-se à presença de súbitos ataques de pânico e de preocupações persistentes com as sensações provocadas pelo ataque anterior. As sensações de pânico conduzem a palpitações, arritmia, sudorese, tremor, falta de ar ou sufocamento, onda de calor, parestesias, angústia, desconforto gástrico, tontura, vertigem, medo de perder o controle ou enlouquecer e temor à morte (GRAEFF, 2012).

O tratamento dos transtornos de ansiedade tem sido feito tanto por meio de abordagens psicoterapêuticas como também pelo uso de fármacos ansiolíticos, mas também por drogas antidepressivas como Antidepressivos Tricíclicos (ADTs), Imipramina e Clormipramina, que atuam através da recaptação de serotonina e noradrenalina, e os Inibidores Seletivos de Recepção de Serotonina (ISRS) como Fluoxetina e o Escitalopram. No entanto, devido a um menor potencial de gerar efeitos adversos, os ISRS são hoje considerados fármacos de primeira escolha (BALDWIN et al., 2005).

Os benzodiazepínicos de alta potência têm sido prescritos concomitantemente aos ISRS, no intuito de controlar os sintomas no primeiro estágio do tratamento com antidepressivos, devido à ação terapêutica dos (ISRS) que possui uma demora para instalação de seus efeitos

benéficos, entre 3 a 4 semanas, e, ainda assim, alguns indivíduos são resistentes ao tratamento (ARTIGAS et al., 1996; HOFFMAN; MATHEW, 2008).

Diante de tais constatações, muitos pesquisadores têm buscado novas estratégias terapêuticas. Numa abordagem neurobiológica torna-se imprescindível identificar outros sistemas de neurotransmissão, neurotransmissores e receptores, que quando desequilibrados podem favorecer a manifestação dos transtornos de ansiedade.

Dentre as várias possibilidades, uma constatação clínica em especial chamou a atenção: o efeito benéfico da Buprenorfina no tratamento transtornos de humor em pacientes resistentes ao tratamento com fármacos antidepressivos (BODKIN et al., 1995). Esse fármaco é um agonista parcial μ e antagonista κ .

De particular interesse para o presente trabalho, tem sido demonstrado que opioides endógenos estão envolvidos na modulação das reações aversivas relacionadas com o medo e ansiedade (COIMBRA et al., 1996; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; COIMBRA et al., 2000). Grande parte dos estudos realizados com este enfoque têm realizado suas análises após manipulações farmacológicas na Substancia Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPD). Nessa região mesencefálica, encontram-se localizados receptores opioides dos subtipos μ , κ e δ , porém há uma predominância dos receptores μ , cuja estimulação tem sido relacionada à ansiólise, enquanto que a ativação dos receptores κ tem sido atrelada à ansiogênese (MOTTA et al., 1995; MORGAN et al., 1998).

No entanto, os fármacos até então testados, especialmente os agonistas μ -opioides plenos como a Morfina, são conhecidos por causarem efeitos adversos, em decorrência do seu uso contínuo, dentre eles a euforia, a tolerância e a dependência (THANAWALA et al., 2008; TIAN et al., 2009; WHEELER-COWAN, 1991; PASTERNAK; PAN, 2013), o que contra indicaria o tratamento ou a associação com outras substâncias na clínica. Considerando que agonistas parciais μ -opioides como a Buprenorfina, possuem características farmacológicas peculiares, com alta afinidade e dissociação lenta desses receptores (LIKAR, 2006), este fármaco poderia se constituir em uma expressiva alternativa farmacológica no tratamento dos transtornos de ansiedade.

1.1 Epidemiologia da ansiedade

Os transtornos mentais têm aumentado mundialmente e, segundo World Health Organization (WHO, 2015), esses transtornos representam 30% das doenças não fatais que mais atingem a população nas últimas décadas. Dados estatísticos apontam um crescimento de 416 milhões para 615 milhões de pessoas acometidas, ou seja, um crescimento de 50%. Nessa proporção, 10% da população mundial é acometida por tais transtornos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014, 33% da população mundial foi afetada por transtornos de ansiedade, estando o Brasil dentre os primeiros da lista nesse contexto. Segundo o relatório da São Paulo Megacity Mental Health Surve, em 2009 a população metropolitana de São Paulo obteve destaque no que tange aos transtornos mentais, sendo a ansiedade apontada como o transtorno mais comum, associada à urbanização com privações sociais, os dados mostrados pelo relatório apontam que 19,9% das 5.037 pessoas pesquisadas sofrem dessas perturbações psíquicas com efeitos fisiológicos, na maioria das vezes ignorada por muitos, sendo que esses efeitos em muitos casos se agravam desestabilizando a vida social e econômica dessas pessoas.

1.2 Neurobiologia da Ansiedade

Os transtornos de ansiedade possuem, em sua síntese, uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e socioculturais (GRAEFF, 1996).

A perspectiva biológica dos transtornos de ansiedade deriva da abordagem evolutiva baseada na idéia da seleção natural, elaborada por Charles Darwin, apresentada em seu livro “A expressão das emoções nos homens e animais”, publicado em 1872. O próprio Darwin destacou o valor adaptativo das emoções. De acordo com esta orientação teórica, a ansiedade tem raízes nas reações de defesa dos animais diante de situações de perigo comumente encontradas no ambiente em que as espécies evoluíram (GRAEFF, 2012).

Pesquisas têm evidenciado que a manifestação da ansiedade se relaciona com os mecanismos de defesa dos animais diante de estímulos ameaçadores e situação de risco (GRAEFF; HETEM, 2012).

Nesse contexto, o casal de pesquisadores Caroline e Robert Blanchard (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993, 2001) avaliou o comportamento de ratos expondo-os a situações de perigo real, descritos como comportamento de avaliação de risco (*risk assessment behavior*), caracterizando três níveis de defesa: potencial, distal ou proximal.

- Perigo potencial: o animal investiga o ambiente para identificar o perigo desconhecido, induzindo a comportamentos de esquiva, o qual se relaciona à emoção identificada como ansiedade;
- Perigo distal: quando a ameaça é real o animal manifesta comportamentos de fuga, manifestando comportamento de medo e, quando a fuga não é possível, o animal conduzido pela tensão apresenta imobilidade, um estado de congelamento (*freezing*);
- Perigo proximal: o predador está em contato com a presa, sendo assim, o animal reage mediante a ameaça apresentando comportamento de luta/fuga, caracterizando raiva/pânico.

Já se conhece que os sistemas cerebrais responsáveis por diferentes estratégias de defesa são mediados por vários neurotransmissores que participam, em maior ou menor grau, da modulação dos comportamentos defensivos (HANDLEY, 1994). Para Mongeau, Blier e De Montigny (1997), dois sistemas, nor-adrenérgico e serotonérgico, estão envolvidos na gênese da ansiedade.

Mais especificamente em relação ao sistema serotonérgico, Deakin e Graeff (1991) propuseram que os transtornos de ansiedade possuem mais de um mecanismo de controle: 1. Via serotonérgica prosencefálica do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) que se projeta para o Córtex Pré-Frontal, Hipocampo, e Amígdala. Esta facilitaria a resposta à aproximação de uma ameaça, a um perigo distal, provocando comportamentos como a esquiva inibitória; 2. Via periventricular do NDR, que se projeta para a Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPd). Seria responsável pela gênese/regulação de comportamentos defensivos expressos frente a ameaças próximas ou imediatas, como por exemplo, o comportamento de fuga. O mau funcionamento dessas duas vias serotonérgicas ocasionaria transtornos específicos de ansiedade, sendo que distúrbios na via NDR/Córtex Pré-Frontal/Hipocampo/Amígdala seriam responsáveis pela manifestação do transtorno de ansiedade generalizada, e na via NDR/SCPd o transtorno de pânico; 3. Projeções do Núcleo Mediano da Rafe (NMR) a receptores 5-HT_{1A} localizados no Hipocampo estariam relacionadas com a manifestação da ansiedade, mas especificamente do Transtorno de Ansiedade

Generalizada (ANDRADE et al., 2013). Esta via foi apontada por Gray e McNaughton (2000) como fundamental na compreensão dos processos de inibição comportamental. A ativação desse sistema por sinais condicionados de punição ou frustração, estímulos ameaçadores ou situações de novidade provoca inibição do comportamento. O animal aumenta sua vigilância e sua atenção, gerando comportamentos associados à ansiedade (GRAEFF, 2012).

1.3 O Labirinto em T Elevado: um modelo de avaliação experimental de ansiedade

A maioria dos testes comportamentais utilizados com o objetivo de avaliar a ansiedade são abrangentes e não discriminam subtipos de ansiedade. Fundamentados nos pressupostos acima descritos, um grupo de pesquisadores idealizou o modelo animal de avaliação de ansiedade denominado Labirinto em T elevado - LTE (GRAEFF et al., 1993; 1996; 1998; VIANA et al., 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997). O Labirinto em T Elevado foi desenvolvido para testar a hipótese que a serotonina tem um papel dual na regulação de comportamentos de defesa associados com comportamentos de ansiedade e do pânico. O LTE é derivado do aparato experimental Labirinto em Cruz elevado - LCE (PELLOW et al., 1985). É constituído por três braços em forma de T, de mesmas dimensões, sendo um braço fechado e dois abertos, a uma altura de 50 cm do chão. O braço fechado dispõe de paredes laterais de madeira, perpendicular aos braços abertos. Para a avaliação comportamental o animal é colocado no final do braço fechado durante três vezes consecutivas e aguarda-se o tempo em segundos que o animal leva para sair deste compartimento, um comportamento defensivo chamado esquiva inibitória. Na sequência, o animal é colocado na extremidade do braço aberto, por três vezes consecutivas, mensurando o tempo que o animal leva para se deslocar deste braço para o centro do aparato, comportamento este denominado fuga.

A validação farmacológica deste teste é amplamente e significativamente suportada, demonstrando claramente que as esquivas estão relacionadas com o Transtorno de Ansiedade Generalizada e as fugas relacionadas com o Transtorno do Pânico (ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

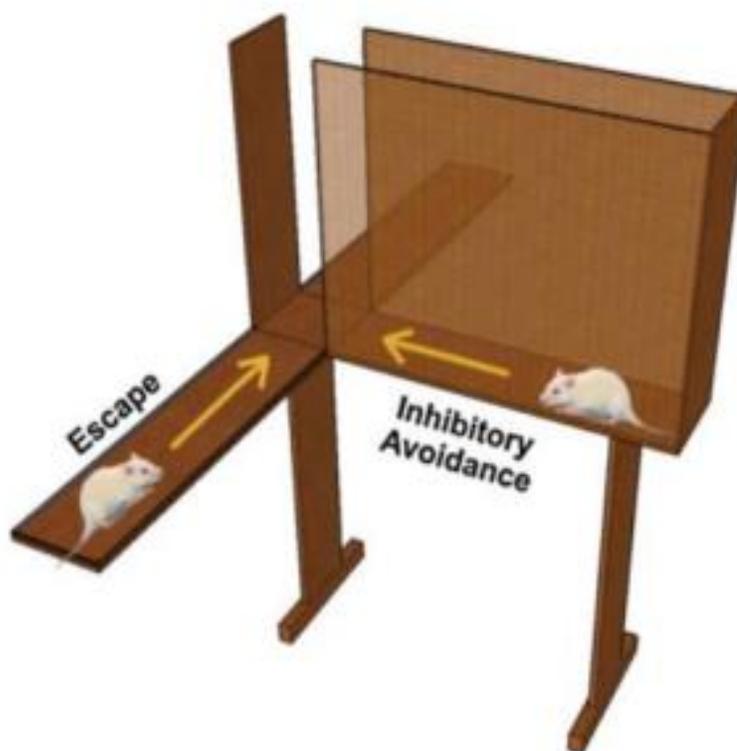


Figura 1- Labirinto em T Elevado (LTE): um modelo animal que discrimina dois subtipos de ansiedade – Transtorno de Ansiedade Generalizada e Transtorno do Pânico. Fonte: ZANGROSSI; GRAEFF (2014).

1.4 Psicofarmacologia da ansiedade

Historicamente, substâncias que agem no SNC, denominadas fármacos psicoativos, começaram a ser descobertas por Henri Laborit (1940), que percebeu o efeito tranquilizante de substâncias anti-histamínicas. Em meados de 1949, John Cade, descobriu que o Lítio poderia ser utilizado para o tratamento de mania e depressão. Os tratamentos psicofarmacológicos a princípio, foram conduzidos com a administração de sedativos como hidratos de cloral, brometos (brometo de sódio), possuindo alta atividade tóxica. Esses tratamentos foram aplicados em pacientes neurologicamente excitados. Pacientes neurologicamente deprimidos foram tratados com estimulantes como a cafeína e anfetaminas.

Os Barbitúricos foram inseridos no início do século XX, evoluindo para derivados de alcalóides (*Rauwolfia serpentina*) como a Reserpina. Posteriormente substituídos pelos

antidepressivos tricíclicos (ADTs) como a Clorpromazina, e inibidores das monoaminaoxidase (IMAO). Na sequência foram introduzidos os Neurolépticos e Benzodiazepínicos (BZDs) - (Clordiazepóxido), com expressiva ampliação no desenvolvimento de novas classes de BZDs. No entanto, dentre os seus efeitos colaterais, a dependência e abuso levaram os pesquisadores à procura de novos compostos.

Os fármacos antidepressivos passaram também a ganhar ênfase nos tratamentos dos transtornos de ansiedade. A Buspirona, agonista dos receptores $5HT_{1A}$, destacou-se inicialmente por não causar dependência, efeitos sedativos e hipnóticos. Os antidepressivos de nova geração, Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) foram introduzidos na década de oitenta causando uma revolução nos tratamentos relacionados aos Transtornos de Ansiedade e nos distúrbios de depressão. O primeiro a ser introduzido foi a Fluoxetina, sendo largamente administrada até os dias atuais. Outros ISRS foram introduzidos no mercado, tais como, o Citalopram, a Fluvoxamina, a Paroxetina, a Sertralina e o Escitalopram, com maior eficácia, tolerância e segurança diante de significativa diminuição dos efeitos colaterais (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GABBARD, 2009; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; KAPLAN; SADOCK; GREBB, 1997; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

No entanto, um dos grandes problemas dos ISRS é a demora para instalação dos seus efeitos benéficos, sendo que muitas vezes no período inicial de tratamento se constata até mesmo uma potencialização dos sintomas aversivos da ansiedade e do pânico (BARBUI et al., 2007). Visando minimizar este quadro, muitos clínicos associam os ISRS aos BZDs para obtenção de resultados imediatos, especialmente nos estágios críticos dessas patologias. Entretanto, o uso de BZDs pode induzir a dependência farmacológica e psíquica. Ainda assim, existem muitos casos relatados de resistência farmacológica com relação à sua eficácia (MITTE et al., 2005; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

Tem sido demonstrado experimentalmente que na condição pré tratamento com ISRS, os neurotransmissores são liberados em níveis baixos, exercendo pouca atividade dos receptores pós-sinápticos (baixa sinalização), como demonstra a Figura 2 (NADAL-VICENS et al., 2009).

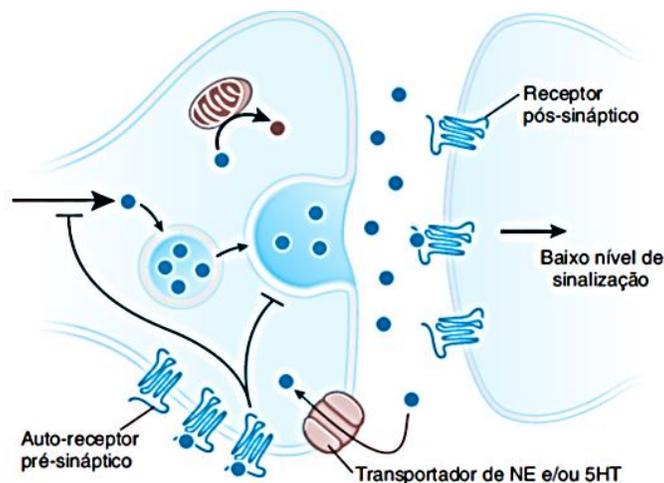


Figura 2 – Mecanismo da neurotransmissão serotoninérgica e nor-adrenérgica central antes do tratamento. Fonte: NADAL-VICENS et al., 2009.

A administração aguda de fármacos antidepressivos resulta em liberação aumentada de neurotransmissores e/ou aumento da duração da ação dos neurotransmissores na fenda sináptica. Ambos os efeitos produzem aumento da estimulação dos auto-receptores inibitórios, com inibição aumentada da síntese de neurotransmissores e da exocitose. O efeito final consiste em reduzir o efeito inicial da medicação e a atividade dos receptores pós-sinápticos permanece em níveis de pré-tratamento, como observado na Figura 3.

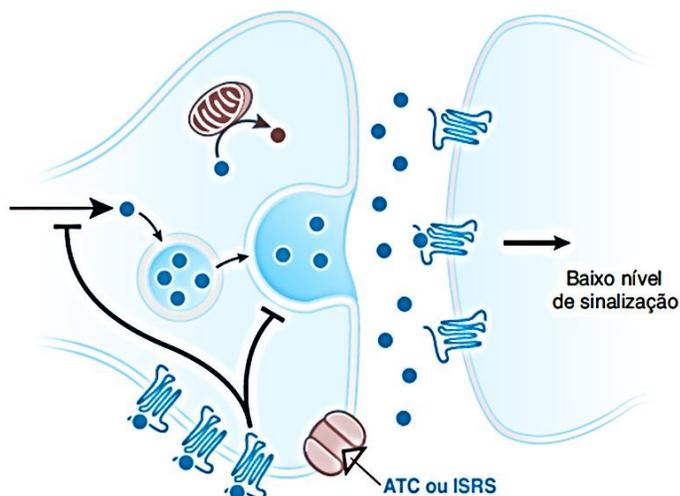


Figura 3 - Mecanismo da neurotransmissão serotoninérgica e nor-adrenérgica central em decorrência do tratamento agudo. Fonte: NADAL-VICENS et al., 2009.

A administração crônica de fármacos antidepressivos resulta em dessensibilização dos auto-receptores pré-sinápticos, como consequência, ocorre redução na inibição da síntese de neurotransmissor e da exocitose, conforme ilustrado na Figura 4. O efeito final consiste em aumento de atividade dos receptores pós-sinápticos, levando a um efeito terapêutico.

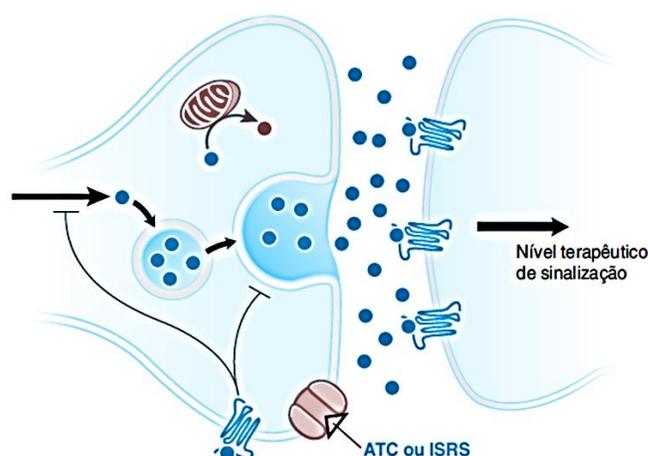


Figura 4 - Mecanismo da neurotransmissão serotoninérgica e nor-adrenérgica central em decorrência do tratamento crônico. Fonte: NADAL-VICENS et al., 2009.

1.5 O sistema opioidérgico e serotoninérgico e suas possíveis interações

O sistema opioidérgico possui um papel de extrema importância na modulação e transmissão da dor. Receptores opioidérgicos encontram-se em órgãos periféricos como coração, pulmão e sistema digestório e no sistema nervoso central.

Agonistas opioides puros (Morfina, Dimorfina, Petidina, Fentanil) apresentam alta afinidade aos receptores opioides. Agonistas parciais (Buprenorfina, Pentazocina), ao ligarem-se em receptores opioides, produzem efeito submáximo quando comparados aos agonistas puros. Antagonistas opioides (Naloxone, Naltrexone) possuem afinidade a esses receptores.

De acordo com a União Internacional de Farmacologia (International Union of Pharmacologists- IUPHAR), como pode ser observado na Tabela 1, os receptores opioides são classificados como:

- MOP (receptor peptídico - opioide μ)

- KOP (receptor peptídico - opioide kappa)
- DOP (receptor peptídico - opioide delta)
- NOP (receptor peptídico - FQ de nociceptinasorfanina)

Tabela 1 - Opioides e sua seletividade por diferentes receptores opioides

OPIOÍDE	TIPOS DE RECEPTORES			
	MOP	KOP	DOP	NOP
<i>Endógeno</i>				
Beta-endorfina	+++	+++	+++	-
Encefalina	+	-	+++	-
Dinorfina A & B	++	+++	+	+
Nociceptina/orfanina FQ	-	-	-	+++
<i>Drogas Clínicas</i>				
<i>Agonistas</i>				
Morfina	+++	+	+	-
Petidina	+++	+	+	-
Diamorfina	+++	+	+	-
Fentanil	+++	+	-	-
<i>Agonistas parciais</i>				
Buprenorfina	++	+	-	-
Pentazocina	-	++	-	-
<i>Antagonistas</i>				
Naloxone	+++	++	++	-
Naltrexone	+++	++	++	-

+ = baixa afinidade; ++ = afinidade moderada; +++ = alta afinidade; - = ausência de afinidade

Os neurotransmissores opioides são classificados como neuropeptídios endógenos, divididos em três classes: Encefalinas, Dinorfinas e β -endorfina, atuando no sistema nervoso central e em tecidos periféricos, sobre receptores acoplados à proteína G.

Mediante a ativação dessa proteína ocorre uma cascata de eventos: fechamento de canais de cálcio voltagem dependentes, redução na produção de Monofosfato de Adenosina cíclico (AMPc) e estímulo ao efluxo de potássio resultando em hiperpolarização celular, causando redução da excitabilidade neuronal e redução da neurotransmissão de impulsos nociceptivos. A proteína G é denotada por três subunidades: alfa, beta e gama. A subunidade interage com canais de cálcio e potássio e com a adenilciclase, diminuindo o AMPc, causando diminuição da excitabilidade neuronal, conforme ilustrado na Figura 5.

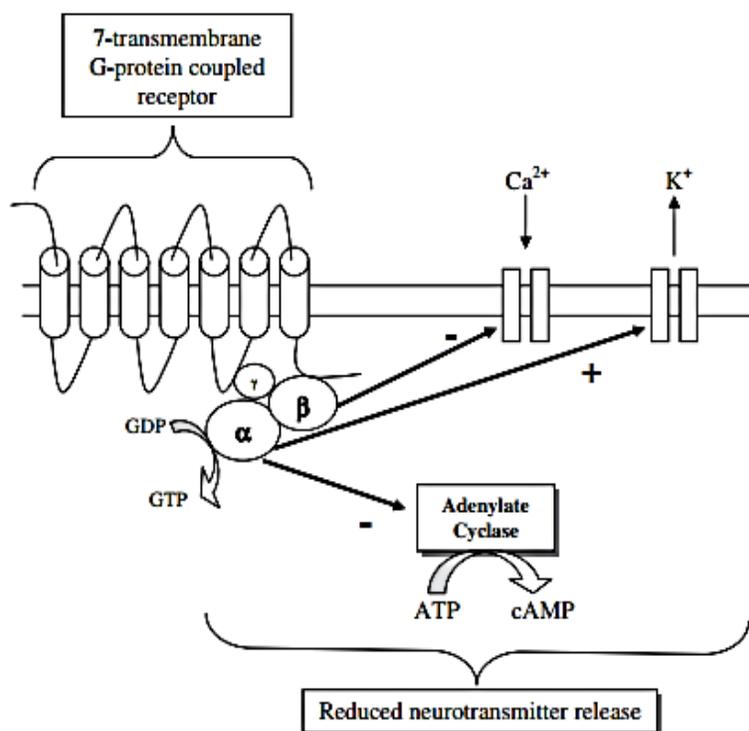


Figura 5 – Eventos moleculares a partir da ação de opioides sobre a proteína G.

Fonte: University Department of Cardiovascular Sciences (PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS GROUP, 2014).

Tem sido descrito que os receptores opioides endógenos estão envolvidos na modulação das reações aversivas moduladas pela SCPD (COIMBRA et al., 1996; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; COIMBRA et al., 2000). Nessa região mesencefálica, estão localizados os receptores opioides dos subtipos μ , κ e δ , porém há uma predominância dos receptores μ , cuja estimulação leva a efeitos ansiolíticos, enquanto que a ativação dos receptores κ causa o efeito oposto (MOTTA et al., 1995; MORGAN et al., 1998).

Por exemplo, a administração intra-SCPD de baixas doses de morfina em ratos submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) causa efeito ansiolítico, que é bloqueado pelo pré-tratamento sistêmico com a Naltrexona (ANSELONI et al., 1999) ou com a Naloxona (MOTTA; BRANDÃO, 1993), ambos antagonistas inespecíficos de receptores opioides. Efeito ansiolítico também é observado em ratos tratados localmente com o agonista seletivo de receptores μ -opioide, DAMGO, sendo que o pré-tratamento intraperitoneal com

Naltrexona inibe esse efeito (MOTTA; PENHA; BRANDÃO, 1995). No mesmo modelo experimental, a microinjeção na SCPD do agonista seletivo κ U-50488-H (MOTTA; PENHA; BRANDÃO, 1995), ou de altas doses de morfina (ANSELONI et al., 1999; MOTTA; BRANDÃO, 1993; NOBRE et al., 2000) desencadeia efeito ansiogênico, que são inibidos pela administração sistêmica de nor-BNI, um antagonista preferencial para receptores κ (ANSELONI et al., 1999; MOTTA; PENHA; BRANDÃO, 1995; NOBRE et al., 2000).

Na sequência desses estudos, Roncon e colaboradores (2013) mostraram que a microinjeção intra-SCPD de morfina causa efeito panicolítico no teste do LTE, que é bloqueado pelo pré-tratamento local com a naloxona ou com o antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY-100635, mostrando haver uma interação entre as neurotransmissões serotoninérgica e opioidérgica na SCPD. No mesmo sentido, foi mostrado ainda que o pré tratamento com naloxona bloqueia o efeito panicolítico promovido pelo agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, ambos microinjetados intra-SCPD.

Ainda assim, procurando-se avaliar quais subtipos de receptores opioides estariam envolvidos nesses efeitos, Roncon e colaboradores (2013) mostraram que o pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptores μ -opioide CTOP bloqueia o efeito anti-fuga do agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, quando microinjetados intra-SCPD. Complementarmente, constatou-se que o tratamento combinado de doses sub-eficazes do agonista seletivo de receptores μ -opioides DAMGO e de 8-OH-DPAT também causa efeito do tipo panicolítico no LTE.

Os achados de que receptores 5-HT_{1A} e μ -opioide interagem de forma sinérgica são sustentados por evidências eletrofisiológicas obtidas previamente na Substancia Cinzenta Periaquedutal Ventral (SCPV). Kishimoto e colaboradores (2001) mostraram que a ativação de receptores 5-HT_{1A} e μ -opioides inibem sinérgicamente a liberação de GABA nesta estrutura, sendo este o mecanismo postulado como responsável pelo controle da dor exercido por essa região. Em adição, lesões em neurônios serotoninérgicos reduzem o *binding* do agonista seletivo de μ -opioide, DAMGO, a receptores μ -opioide na SCPD, mas não afetam o *binding* do agonista seletivo de receptores δ -opioides, o [3H]DPDPE (ALLEN et al., 1993). Fundamentando essas informações, Cussac et al. (2012) mostraram, em estudo *in-vitro* na SCP, que receptores 5-HT_{1A} e μ -opioides podem formar heterodímeros, isto é, formam complexos contendo os dois receptores, podendo funcionar assim de maneira interdependente.

Partindo do pressuposto de que existe uma interação entre sistema serotoninérgico e opioidérgico, propõe-se a associação de um fármaco da classe dos opioides com os ISRS para abreviar os efeitos tardios já mencionados acima no texto e para conter a exacerbação sintomática dos transtornos de ansiedade no início do tratamento.

O opioide de interesse nesse trabalho é a Buprenorfina, derivado da tebaína, alcalóide extraído da *Papaver somniferum* (Papoula). É um agonista parcial μ devido a sua alta afinidade com esses receptores, no entanto, possui atividade intrínseca baixa. Possui características de antagonista κ , não apresentando afinidade por receptores δ .

A forma farmacêutica da Buprenorfina no Brasil é encontrada em adesivos transdérmicos de nome comercial Restiva, de 5mg, que libera 5 microgramas/hora de Buprenorfina; 10mg, que libera 10 microgramas/hora de Buprenorfina; e 20mg, que libera 20 microgramas/hora de Buprenorfina. A Restiva é fabricada por LTS – Lohmann Therapie Systeme A.G. – na Alemanha, e importada para o Brasil. É embalada pela ZODIAC PRODUTOS FARMACÊUTICOS S/A., em Pindamonhangaba-SP, sendo que as apresentações injetáveis ou líquidas foram suspensas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e impedidas de importação pelo mesmo órgão pela PORTARIA/SVS Nº 344 (BRASIL, 1998). A medicação é controlada e vendida por prescrição médica através de receita A1 para prescrição de entorpecentes e psicotrópicos.

A Buprenorfina se apresenta mais potente que a morfina, a dose de 0,4mg tem equivalência analgésica a 10mg de morfina (GLOVER; DAVIS, 2008). O pico de concentração sanguínea para administração oral da Buprenorfina é de 1 a 2 horas, e para a administração intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) é de 5 minutos e o tempo de meia-vida da dissociação desse opioide é de 166 minutos, o que sugere que seus níveis plasmáticos não acompanham as manifestações fisiológicas. A meia-vida plasmática é de aproximadamente 3 horas e isso não guarda relação com o desaparecimento dos efeitos. Esse fármaco é metabolizado pela CYP3A4 no fígado para nor-Buprenorfina metabólito da Buprenorfina, que pode exercer ação farmacológica de analgesia mínima (LIKAR, 2006). Seus metabólitos são excretados na urina e nas fezes. O aparecimento de sintomas mínimos de abstinência quando surgem, são tardios, não são tão graves e desaparecem em 1 a 2 semanas (BRUNTON; CHARNER; KNOLLMANN, 2012; RANG; DALE, 2004).

Os efeitos ansiolítico e antidepressivo são atribuídos ao antagonismo κ , e os efeito analgésico mediado pela ativação dos receptores μ (GLOVER; DAVIS, 2008; KARP et al., 2014; LIKAR, 2006; VIRK et al., 2009; YAMAMOTO; SHONO; TANABI, 2006).

O efeito teto da Buprenorfina está associado a uma curva dose-resposta em forma de sino, sendo as doses seguras, evitando efeitos colaterais como depressão respiratória, proporcionando segurança no tratamento de abuso de drogas (LIKAR 2006).

A Buprenorfina inibe a dessensibilização dos receptores opioides, devido a uma lenta cinética de associação e dissociação do receptor o que impede a tolerância comum aos opioides. O fato de ser um agonista parcial, impossibilita a ocorrência de disforia. Essas características únicas da Buprenorfina distinguem-na de outros opioides, sendo relevante para a prática clínica (LIKAR, 2006).

De acordo com Glover e Davis (2008), tanto a morfina quanto a Buprenorfina foram capazes de diminuir a expressão do sobressalto potencializado pelo medo, em ratos, sendo que a Buprenorfina foi 40 vezes mais potente que a morfina. Falcon e colaboradores (2015) evidenciaram efeito ansiolítico e antidepressivo resultante do tratamento agudo com Buprenorfina por via intraperitoneal, tanto 30 minutos após as injeções, como também 24 horas depois. No entanto, 24 horas depois não houve aumento de atividade motora, como o que se constatou na avaliação imediata. Bershad e colaboradores (2015) submeteram sujeitos saudáveis ao teste de falar em público e aqueles que receberam Buprenorfina apresentaram menores taxas de cortisol salivar comparados ao grupo controle, cujos sujeitos foram tratados com placebo.

Com base em tais descrições cabe perguntar: será que a Buprenorfina afeta as respostas comportamentais relacionadas com a manifestação de diferentes subtipos de ansiedade? Será que a Buprenorfina associada à Fluoxetina poderá antecipar os efeitos ansiolíticos e panicolíticos deste ISRS?

Fundamentados em estudos que mostraram que mecanismos opioides favorecem a atividade inibitória da serotonina em neurônios da SCPD que modulam a fuga/pânico descritos nesta introdução, possivelmente por meio da formação de heterodímeros entre receptores 5-HT_{1A} e μ -opioide, o presente estudo apresenta a hipótese que a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide, poderia se constituir em um agente ansiolítico e panicolítico. Além disso, propõe hipoteticamente que a Buprenorfina, quando

associada a um antidepressivo ISRS, que normalmente só ocasiona na clínica efeitos ansiolítico e anti-pânico após 21 dias de tratamento, anteciparia tais efeitos.

Assim, visando testar a hipótese acima explicitada, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da Buprenorfina, associada ou não ao tratamento subcrônico com Fluoxetina, sobre respostas comportamentais de esquivas e fugas de ratos no LTE, que correspondem, respectivamente, à manifestação da ansiedade generalizada e do pânico.

Sequencialmente será apresentado um artigo contendo a análise dos resultados de três experimentos realizados com esta finalidade.

REFERÊNCIAS

ALLEN, D.I.; JHONSON A.E.; TEMPREI A. et al. Serotonergic lesions decrease mu- and delta-opiate receptor binding in discrete areas of the hypothalamus and in the midbrain central Gray. **Brain Research**, v. 625, p. 269-275, 1993.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - APA. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5)**. Tradução de Maria Inês Corrêa Nascimento et. al. Porto Alegre: Artmed, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-5** (5th. ed.). Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F.G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1107- 1115, 2013.

ANSELONI, V.C.; COIMBRA, N.C.; MORATO, S. et al. A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Experimental Brain Research**, v.129, n. 2, p. 260-268, 1999.

ARTIGAS, F.; ROMERO, L.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. **Trends in Neurosciences**, v. 19, p. 378-383, 1996.

BALDWIN, D.S.; ANDERSON, I. M.; NUTT, D. J. et al. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 6, p. 567-596, 2005.

BARBUI, C. et al. Withdrawn: Treatment discontinuation with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) versus tricyclic antidepressants (TCAs). **Cochrane Database System Review**, v. 18, n. 3, 2007.

BERSHAD, A.K.; JAFFE, J.H.; CHILDS, E. et al. Opioid partial agonist Buprenorphine dampens response to psychosocial stress in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 281-288, 2015.

BODKIN, J.A.; ZORNBERG, G.L.; LUKAS, S.E. et al. Buprenorphine treatment of refractory depression. **Journal Clinical Psychopharmacology**, v. 15, p.49 – 57, 1995.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; ROGER, R.J.; MAGEEL, K.; BLANCHARD, Defense system psychopharmacology: ethologic approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 155-65, 1993.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Defensive behaviors, fear and anxiety .In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 17, p. 63-79, 2008.

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

BRANDÃO, M.L.; GRAEFF, F.G. **Neurobiologia dos Transtornos Mentais**. São Paulo: Atheneu, 2014.

BRUNTON, L.L.; CHARNER, B. A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman (12 ed.)**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

COIMBRA, N.C.; BRANDAO, M.L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, v. 87, n. 1, p. 97-103, 1997.

COIMBRA, N.C.; EICHENBERGER, G.C.D.; GORCHINSKI, R. T. et al. Effects of the blockade of opioide receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. **Brain Research**, v. 736, p. 348-352, 1996.

COIMBRA, N.C.; OSAKI. M. Y.; EICHENBERGER, G.C.D. et al Effects of opioide receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattusnorvegicus* (Rodentia, Muridae). **Psychopharmacology**, v. 152, p. 422-430, 2000.

CUSSAC, D.; RAULY-LESTIENNE, I.; HEUSLER, P.; FINANA, F.; CATHALA,C.; BERNOIS, S.; DE VRIES, L. μ -Opioid and 5-HT_{1A} receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways. **Cell Signal**, v. 24, n. 8, p. 1648-57, 2012.

DARWIN, C.A. A expressão das emoções nos homens e nos animais. Tradução de Garcia LSL, **Companhia das Letras**, São Paulo, 2000.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305-315, 1991.

GLOVER, E.M.; DAVIS, M. Anxiolytic-like effects of morphine and buprenorphine in the rat model of fear-potentiated startle: tolerance, cross-tolerance, and blockade by naloxone. **Journal Psychopharmacology**, v. 198, p. 167-180, 2008.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience Biobehavioural Review**, v.23, n. 2, p. 237-246, 1998.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological**

Research, v. 26, n. 1, p. 67-70, 1993. GRAEFF F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 811-29, 1994.

GRAEFF, F.G. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 366-375, 2012.

GRAEFF, F.G. Medicamentos antiansiedade. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 165-204.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behaviour and anxiety. **Reviews in the Neurosciences**, v. 4, p. 181-211, 1993.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; ANDRADE, T.G.C.S.; DEAKIN, J.F.W. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F.G. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 21-24, 2003.

GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. **Transtornos de Ansiedade**. 2. ed. São Paulo, Atheneu, 2012.

GRAY, J.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1994.

HOFFMAN, E.J.; MATHEW, S.J. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 75, p. 247-262, 2008.

INTERNATIONAL UNION OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY - UPHAR, 2006. <https://iuphar.org/>(acessado 13 março de 2017).

KISHIMOTO K; KOYAMA S; AKAIKE N. Synergistic mu-opioid and 5-HT_{1A} presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 5, p. 529-538, 2001.

LIKAR, R. Transdermal buprenorphine in the management of persistent pain – safety aspects. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 2, n. 1, p. 115-125, 2006.

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J.A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n.3, p. 161-176, 2000.

MORGAN, M. M.; WHITNEY, P. K.; GOLD, M. S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 804, p. 159-166, 1998.

MOTTA V.; BRANDÃO M.L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.44, n. 1, p. 119-125, 1993.

MOTTA, V.; PENHA, K.; BRANDAO, .M.L. Effects of microinjections of μ and κ receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. **Psychopharmacology**, v. 120, n. 4, p. 470-474, 1995.

MITTE, K. et al. A Meta-analytic Review of the Efficacy of Drug Treatment in Generalized Anxiety Disorder. **Journal Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 141-150, 2005.

NADAL-VICENS, M. et. al. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. In: GOLAN, David et. ali. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2014.p. 186-202.

NOBRE, M.J.; RIBEIRO DOS SANTOS, N.; AGUIAR, M. S. et al. Blockade of μ - and activation of κ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behavior in rats tested in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 404, n. 1-2, p. 145-151, 2000.

PASTERNAK, G.W.; PAN, Y.X. Mu Opioids and their receptors: evolution of a concept. **Pharmacology Review**, v. 65, n. 4, p. 1257-1317, 2013.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.F. S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

RAVINDRAN, L. N.; STEIN, M. B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **Journal Clinical Psychiatry**, v.71, n.7, p.839-854, 2010.

RONCON, C M.; BIESDORF, C.; COIMBRA, N.C. et al. Cooperative regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors in the rat periaqueductal grey matter by 5-HT_{1A} and μ -receptors. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 12, p. 1141-1148, 2013.

SÃO PAULO MEGACITY MENTAL HEALTH SURVEY – A population-based epidemiological study of psychiatric morbidity in the São Paulo metropolitan area: aims, design and field implementation. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.31 n.4 São Paulo, 2009.

THANAWALA, V.; KADAM, V.J.; GHOSH, R. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 10, p. 887–894, 2008.

TIAN, X.; CHEN, J.; XIONG, W. et al. Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1348-1354, 2009.

UNIVERSITY DEPARTAMENT OF CARDIOVASCULAR SCIENCES- Pharmacology And Therapeutics Group, 2014.

VIANA MB.; TOMAZ C.; GRAEFF F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, n.3, p.549-554, 1994.

VIRK, M. et al. Buprenorphine is a weak partial agonist that inhibits opioid receptor desensitization. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 22, p. 7341-7348, 2009.

WHEELER, A.; COWAN, A. Buprenorphine and morphine cause antinociception by different transduction mechanisms. **European Journal Pharmacology**, v. 195, p. 411-413, 1991.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental Health Organização Mundial de Saúde**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>Acesso em 20/02/2017.

YAMAMOTO, T.; SHONO, K.; TANABI, S. Buprenorphine activates mu and opioid receptor like-1 receptors simultaneously, but the analgesic effect is mainly mediated by mu receptor activation in the rat formalin test. **Journal of Pharmacology**, v. 318, n. 1, p. 206-213, 2006.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v.44, n. 1, p. 1-5, 1997.

ZANGROSSI-JR, H.; GRAEFF, F.G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. 3, p. 397-406, 2014.

ARTIGO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE BUPRENORFINA E FLUOXETINA NA MANIFESTAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE
GENERALIZADA E COM O PÂNICO, NO LABIRINTO EM T ELEVADO**

O artigo aqui apresentado foi redigido conforme as normas da revista **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, exceto pelo posicionamento das Figuras e Tabelas. De acordo com as normas da revista para a submissão, todas elas deveriam ser anexadas ao artigo, mas, para este momento, visando um melhor entendimento do mesmo, foram dispostas na sequência textual. Este estudo fez parte do Projeto Temático 466796/2014-5, apoiado pelo CNPQ “**INTERAÇÃO ENTRE AS NEUROTRANSMISSÕES OPIOIDÉRGICA E SEROTONINÉRGICA NO TRANSTORNO DO PÂNICO: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO FARMACOLÓGICO**”.

RESEARCH REPORT

ASSOCIAÇÃO ENTRE BUPRENORFINA E FLUOXETINA NA MANIFESTAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O PÂNICO, NO LABIRINTO EM T ELEVADO

Josimarí Cristiane Tiemann Araújo², Paloma Molina Hernandez², Mariane Cariati Tirapelle², Ariela de Oliveira Pedro Bom², Elisabeth Aparecida Audi³, Frederico Guilherme Graeff⁴, Hélio Zangrossi Junior⁵, Telma Gonçalves Carneiro Sperade Andrade^{1*}

1UNESP – Univ. Estadual Paulista, FCL, Department of Biological Science, Avenida Dom Antônio 2100, 19806-900, Assis, SP, Brazil.

2UNESP – Univ. Estadual Paulista, FCL, Laboratory of Physiology, Assis, SP.

3Departamento de Farmacologia e Terapêutica - Universidade Estadual de Maringá, PR

4Instituto de Neurociências e Comportamento - Ribeirão Preto, SP

5Departamento de Farmacologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, SP

*Endereço de correspondência: mesmo endereço acima.

Endereço de e-mail: raica@assis.unesp.

HIGHLIGHTS

Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS) são utilizados no tratamento da ansiedade.

Os efeitos desejados do ISRS ocorrem somente após administração crônica.

Existe aumento dos sintomas de ansiedade no início da terapia farmacológica com ISRS.

A Buprenorfina causou efeito ansiolítico, mas não afetou respostas relacionadas ao pânico.

A Buprenorfina antecipou o efeito ansiolítico da Fluoxetina, mas não o panicolítico.

RESUMO

Fármacos antidepressivos como os inibidores seletivos de recaptção de serotonina são utilizados no tratamento da ansiedade, pânico e outros transtornos mentais. Os efeitos desejados ocorrem somente após administração crônica, em torno de 3 a 4 semanas após o início do tratamento, com aumento dos sintomas de ansiedade no início da terapia farmacológica, ocasionando a descontinuidade do uso desses fármacos. Além disso, há relatos de resistência a esse tipo de tratamento. Visando encontrar soluções para tais problemas, fundamentados em estudos que mostraram que mecanismos opioides favorecem a atividade inibitória da serotonina em neurônios da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal que modulam a fuga/pânico, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito da Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide, como agente ansiolítico e anti-pânico, como também avaliar se o efeito ansiolítico e antipânico da Fluoxetina seriam antecipados pela associação com a Buprenorfina. Foram realizados 3 experimentos utilizando ratos machos *Wistar* com peso médio de 200g no início das sessões experimentais: 1. Tratamento agudo com Buprenorfina IP nas doses (0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg), tendo como controle positivo o Alprazolam IP (4mg/Kg); 2. Tratamento subcrônico 3 dias com Buprenorfina IP (0,3mg/Kg); 3. Tratamento agudo com Buprenorfina (0,3mg/Kg) - associado ao tratamento subcrônico com Fluoxetina 3 dias IP (10mg/Kg). Após os tratamentos, os animais foram submetidos à avaliação comportamental no Labirinto em T Elevado (LTE) e, subsequentemente, ao Campo Aberto e ao Teste de Transição Claro-Escuro. No experimento 1 o teste comportamental foi repetido 24 horas após a primeira avaliação comportamental. Os resultados mostraram que a Buprenorfina nas doses maiores diminuiu a latência das esquivas, sem alteração das fugas no LTE, diferentemente do que se constatou no tratamento agudo com o Alprazolam, o qual diminuiu também as esquivas, mas aumentou a latência nas fugas, efeitos esses interpretados respectivamente como, ansiolítico e panicolítico. Vinte e quatro horas depois não se constatou mais efeito do Alprazolam, e o efeito da Buprenorfina sobre as esquivas só foi identificado na maior dose e apenas na LB. Em nenhuma das duas situações houve aumento de atividade motora. No teste de Transição Claro-Escuro não se constatou efeito expressivo nas condições estudadas, apenas possibilitou a escolha da maior dose para a continuidade do estudo, já que a intermediária aumentou a atividade motora nesse teste 24h após a injeção. A

Buprenorfina administrada subcronicamente também diminuiu as esquivas, sem afetar a latência das fugas e o comportamento motor no campo aberto. Também não se identificou alterações no Teste de Transição Claro-escuro. A Buprenorfina antecipou o efeito ansiolítico da Fluoxetina, sem afetar as respostas relacionadas com a manifestação do pânico. Entretanto não houve confirmação dos achados no outro teste de ansiedade. Conclui-se que a Buprenorfina, administrada de forma aguda e subcrônica, diminuiu os comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada, e antecipou o efeito ansiolítico da Fluoxetina, podendo se constituir em uma opção relevante no tratamento dos transtornos de ansiedade na clínica, devido à sua baixa capacidade de causar efeitos adversos e também diante da possibilidade de antecipar os efeitos benéficos da fluoxetina, apenas com uma injeção.

Palavras-chave: Buprenorfina. Fluoxetina. Labirinto em T Elevado. Receptores opioides. Transtorno de Ansiedade Generalizada. Transtorno do Pânico.

1. Introdução

Fármacos antidepressivos tais como os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) são atualmente considerados fármacos de primeira escolha no tratamento da ansiedade e da depressão, por exercerem um menor potencial de gerar efeitos adversos (Baldwin et al., 2005).

No entanto, no primeiro estágio do tratamento, esses fármacos apresentam limitações no seu uso: os efeitos desejados ocorrem somente após um período de 3 a 4 semanas do início do tratamento, com aumento dos sintomas de ansiedade na primeira fase da terapia farmacológica. No intuito de controlar os sintomas evidenciados no período inicial do tratamento, fármacos BDZs de alta potência são prescritos concomitantemente com essa classe de antidepressivos, mas os mesmos podem causar efeitos colaterais, dependência e abuso (Artigas et al., 1996; Hoffman e Mathew, 2008). Diante de tais constatações muitos pesquisadores têm buscado novas estratégias terapêuticas.

Dentre as várias possibilidades, uma constatação clínica em especial chamou a atenção: o efeito benéfico da Buprenorfina no tratamento dos transtornos de humor em pacientes resistentes ao tratamento com fármacos antidepressivos (Bodkin et al., 1995). A Buprenorfina, fármaco de grande potencial analgésico (Feng et al., 2012; Glover e Davis, 2008; Virk et al., 2009) é um agonista parcial μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide e tem sido muito utilizado no tratamento da dependência a opiáceos (Thanawala et al., 2008; Tian et al., 2009).

Tem sido descrito que a ativação de receptores κ está relacionada com a manifestação de comportamentos defensivos atrelados ao aumentando da ansiedade, e que o efeito ansiolítico constatado pelo uso da Buprenorfina seria explicado farmacologicamente por seu papel como antagonista de tal receptor (Falcon et al., 2015; Feng et al., 2012). A Buprenorfina então, teria supremacia em relação aos fármacos até então testados, especialmente os agonistas μ -opioides plenos como a Morfina, que são conhecidos por causarem efeitos adversos, em decorrência do seu uso contínuo, dentre eles a euforia, a tolerância e a dependência (Thanawala et al., 2008; Tian et al., 2009; Wheeler-Cowan, 1991; Pasternak; Pan, 2013), o que contraindicaria o tratamento ou a associação com outras substâncias na clínica. Considerando que agonistas parciais μ -opioides como a Buprenorfina, possuem características farmacológicas peculiares, com alta afinidade e dissociação lenta desses receptores (Likar, 2006), este fármaco de fato poderia se

constituir em uma expressiva alternativa farmacológica no tratamento dos transtornos de ansiedade.

Fundamentando esta alternativa, tem sido demonstrado que opioides endógenos estão envolvidos na modulação das reações aversivas relacionadas com o medo e ansiedade (Coimbra et al., 1996; Coimbra; Brandão, 1997; Coimbra et al., 2000). Grande parte dos estudos realizados com este enfoque têm realizado suas análises após manipulações farmacológicas na Substancia Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPD). Nessa região mesencefálica, encontram-se localizados receptores opioides dos subtipos μ , κ e δ , porém há uma predominância dos receptores μ , cuja estimulação tem sido relacionada à ansiólise, enquanto que a ativação dos receptores κ tem sido atrelada à ansiogênese (Motta et al., 1995; Morgan et al., 1998).

Pesquisadores têm demonstrado que a administração de baixas doses de morfina na SCPD de ratos submetidos a testes comportamentais no LCE causa efeito ansiolítico, posteriormente bloqueado pelo pré-tratamento com sistêmico com a Naltrexona (Anseloni et al., 1999) ou com a Naloxona (Motta; Brandão, 1993).

Na sequência desses estudos, Roncon e colaboradores (2013) mostraram que a microinjeção intra-SCPD de morfina causa efeito panicolítico no teste do LTE, que é bloqueado pelo pré-tratamento local com a naloxona ou com o antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY-100635, mostrando haver uma interação entre as neurotransmissões serotoninérgica e opioidérgica na SCPD. No mesmo sentido, foi mostrado ainda que o pré tratamento com naloxona bloqueia o efeito panicolítico promovido pelo agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, ambos microinjetados intra-SCPD.

Ainda assim, procurando-se avaliar quais subtipos de receptores opioides estariam envolvidos nesses efeitos, Roncon e colaboradores (2013) mostraram que o pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptores μ -opioide CTOP bloqueia o efeito anti-fuga do agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, quando microinjetados intra-SCPD. Complementarmente, o tratamento combinado de doses sub-eficazes do agonista seletivo de receptores μ -opioides DAMGO e de 8-OH-DPAT também causa efeito do tipo panicolítico no LTE.

Os achados de que receptores 5-HT_{1A} e μ -opioide interagem de forma sinérgica são sustentados por evidências eletrofisiológicas obtidas previamente na Substancia Cinzenta Periaquedutal Ventral. Kishimoto e colaboradores (2001) mostraram que a ativação de receptores 5-HT_{1A} e μ -opioides inibem sinergicamente a liberação de GABA nesta estrutura, sendo este o

mecanismo postulado como responsável pelo controle da dor exercido por essa região. Em adição, lesões em neurônios serotonérgicos reduzem o binding do agonista seletivo de μ -opioide, DAMGO, a receptores μ -opioide na Substância Cinzenta Periaquedutal, mas não afetam o *binding* do agonista seletivo de receptores δ -opioides, o [3H]DPDPE (Allen et al., 1993). Complementando essas informações, e justificando a importância de estudos animais explorando a interação entre opioides e 5-HT como nova estratégia para o tratamento da ansiedade, Cussac et al. (2012) mostraram, em estudo *in-vitro* na SCP, que receptores 5-HT_{1A} e μ -opioides podem formar heterodímeros, isto é, formam complexos contendo os dois receptores, podendo funcionar assim de maneira interdependente.

Partindo do pressuposto de que existe interação entre sistema serotonérgico e opioidérgico, propõe-se a associação de um fármaco da classe dos opioides com os ISRS para abreviar os efeitos tardios acima mencionados e para conter a exacerbação sintomática dos transtornos de ansiedade.

Com base em tais descrições cabe perguntar: será que a Buprenorfina afeta as respostas comportamentais relacionadas com a manifestação de diferentes subtipos de ansiedade? Será que a Buprenorfina associada à Fluoxetina poderá antecipar os efeitos ansiolíticos e panicóticos deste ISRS?

Fundamentados em estudos que mostraram que mecanismos opioides favorecem a atividade inibitória da serotonina em neurônios da SCPD que modulam a fuga/pânico, descritos nesta introdução, o presente estudo apresenta a hipótese que a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide, poderia se constituir em um agente ansiolítico e panicótico. Além disso, propõe hipoteticamente que a Buprenorfina, quando associada a um antidepressivo inibidor da recaptação da serotonina, que normalmente só ocasiona na clínica efeitos anti-ansiedade e anti-pânico após 21 dias de tratamento, anteciparia tais efeitos.

Assim, visando testar a hipótese acima explicitada, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da Buprenorfina, associada ou não ao tratamento subcrônico com Fluoxetina, sobre respostas comportamentais de esquivas e fugas de ratos no Labirinto em T Elevado, que correspondem, respectivamente, à manifestação da ansiedade generalizada e do pânico.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Biológicas, na Faculdade de Ciências e Letras da UNESP, Campus de Assis.

Foram utilizados Ratos machos *Wistar*, obtidos do Biotério Central da UNESP-Botucatu, pesando 200-250g no início das sessões experimentais. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (32x38x18 cm) forradas com maravalha (cinco ratos por caixa), recebendo água e comida *ad libitum*, exceto durante as avaliações. As caixas ficaram alocadas no biotério de machos do Laboratório de Fisiologia, que possui temperatura constante (aproximadamente $21^{\circ}\text{C} \pm 22^{\circ}\text{C}$) e iluminação controlada por timer, com intensidade de 50 lux no centro da sala (as luzes foram acesas diariamente às 7h00 e apagadas às 19h00). Após a chegada dos animais e agrupamento dos mesmos, estes permaneceram em ambientação no biotério por um período mínimo de uma semana. Foram submetidos à manipulação somente para limpeza e reabastecimento de água e comida três vezes por semana. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento visando minimizar o sofrimento animal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP Assis (Registro 003/2015) (Anexo II).

2.2 Drogas

Foi utilizada a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioides e antagonista κ -opioides, amplamente usado no tratamento da dor. Foram usados adesivos de Buprenorfina (Zodiac), com nome comercial $\text{\textcircled{R}}$ Restiva sistema transdérmico de 5 mg e 10 mg, importados da LTS – Lohmann Therapie Systeme A.G. e embalados no Brasil pela Zodiac, sendo que as apresentações injetáveis ou líquidas foram suspensas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e impedidas de importação pelo mesmo órgão pela Portaria/SVS n° 344 (Brasil, 1998).

Esta medicação é controlada e vendida por prescrição médica através de receita específica para entorpecentes e psicotrópicos, de acordo com a legislação descrita na Portaria/SVS nº 344 (Brasil, 1998), sendo assim, adotou-se o procedimento de extração do fármaco do adesivo para administração por via intraperitoneal (IP).

Para extração do fármaco a partir dos adesivos foram realizados alguns procedimentos: os adesivos com 10mg de Buprenorfina foram recortados, e apenas a região que libera a droga foi colocada em um becker de plástico, com água destilada estéril, no volume de 30ml para cada 10mg. Esse recipiente foi fechado com papel filme plástico e alumínio, e colocado em banho-maria por 27 horas a uma temperatura de 37°C a 40°C. Em seguida os adesivos foram colocados na borda do Becker por 5 minutos para escorrer todo o líquido do mesmo sequencialmente foi armazenado em geladeira coberto com filme plástico e papel alumínio ao abrigo da luz

Foram utilizados os fármacos: Alprazolam 4mg/Kg, (Sigma- USA), e a Fluoxetina 10mg/Kg (Sigma- USA) dissolvidos em solução salina contendo 2% de Tween 80..

2.3 Testes comportamentais

Os testes foram realizados em sala exclusiva para avaliação comportamental do Laboratório de Fisiologia (temperatura de 21°C ± 22°C), no período da tarde, entre 14 e 17 horas. Durante as sessões experimentais, cada rato foi transportado individualmente em uma caixa de polipropileno (28x17x30 cm), forrada com maravalha e coberta com tela e flanela.

Os aparelhos foram iluminados com uma lâmpada led fixada ao teto sobre o aparelho, propiciando uma intensidade luminosa de 50 lux, evitando sombra em qualquer um dos braços. Entre as avaliações os aparelhos foram limpos com álcool a 20%. O experimentador permaneceu fora da sala e os testes foram registrados por sistema de vídeo e analisados por intermédio do programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000).

Teste do Labirinto em T Elevado

Foi utilizado um LTE feito de madeira, constituído por três braços de mesmas dimensões (50x12 cm), elevados a 50 cm do piso. Um dos braços era circundado por paredes laterais (40 cm de altura) e estava disposto perpendicularmente aos 2 outros braços abertos. Os braços abertos eram delimitados por uma proteção de madeira de 1 cm de altura, a fim de se evitar a queda dos

animais. Após dois dias consecutivos de *handling* (manuseio delicado do animal por 5 minutos/dia), 24 horas antes da avaliação comportamental, os animais foram mantidos individualmente, por trinta minutos, em um dos braços abertos do LTE. O braço aberto destinado ao confinamento foi separado dos demais por uma parede de madeira, disposta na linha entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto. Tem sido demonstrado que o confinamento a um dos braços abertos diminui as latências das fugas, tornando o teste mais sensível aos efeitos de drogas (Teixeira et al., 2000). Após este procedimento foram reconduzidos às suas caixas até o dia seguinte. O teste no LTE foi iniciado pela tomada da esquiva inibitória, onde o animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e foi medido o tempo (latência) para o mesmo sair deste braço (Linha de Base). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de trinta segundos entre elas (Esquiva 1 e Esquiva 2). Após 30 segundos do término da tomada da Esquiva 2 foi avaliado o comportamento de fuga. Para isso, o animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto em que foi confinado no dia anterior e foi registrada a latência para a saída do braço aberto. Essa medida foi tomada por três vezes consecutivas, (Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3), com intervalos de 30 segundos entre elas. O tempo máximo de permanência do animal na esquiva ou na fuga foi de 300 segundos. Entre cada tomada o animal foi recolocado por 30 segundos em sua caixa individual aguardando a próxima exposição ao teste. O critério de “saída” consistiu na passagem total das quatro patas do animal pela linha divisória do braço onde foi colocado inicialmente em direção ao centro do aparelho (Graeff 1993; 1998; Viana et al., 1994; Zangrossi e Graeff, 1997).

Teste do Campo Aberto

Visando verificar a influência de alterações na atividade motora no desempenho dos animais no LTE, 30 segundos após a finalização da avaliação no LTE os animais foram colocados no centro do Campo Aberto por 5 minutos e foram contadas quantas vezes os mesmos cruzaram as linhas demarcadas no aparelho. Foi utilizado um aparato de madeira medindo (60x60) cm, com quadrados demarcados de (20x20) cm.

Teste de Transição Claro-Escuro

O Teste de Transição Claro-Escuro foi realizado numa caixa de madeira de (48x24x24) cm, dividida em dois compartimentos de iguais dimensões, uma de cor branca (compartimento

claro), e outro de cor preta (compartimento escuro). Entre os dois compartimentos havia uma abertura (7x6 cm) permitindo a livre transição do animal entre os dois compartimentos. No assoalho da caixa estavam demarcados 8 quadrados de (12x12 cm). A caixa era totalmente fechada por uma tampa de madeira pintada de preto constituindo um compartimento escuro, e uma tampa transparente de vidro possibilitando um compartimento claro.

Após 30 segundos depois de finalizado o Teste do Campo Aberto os animais foram submetidos ao Teste de Transição Claro-Escuro por cinco minutos. Foram registradas e computadas as seguintes variáveis: latência de saída do lado claro, tempo no lado claro, número de tentativas de saída do lado escuro para o lado claro (comportamento denominado “espreita”), número de transições entre os dois compartimentos, número de quadrados percorridos no lado claro.

2.2 Delineamento Experimental

Experimento 1 - Tratamento agudo com Buprenorfina nas doses 0,015 mg/Kg, 0,03mg/Kg 0,3mg/Kg IP, tendo como controle positivo o Alprazolam 4mg/Kg IP: avaliação imediata e 24 horas depois

Neste experimento a Buprenorfina foi injetada IP (0,015 mg/Kg n= 8; 0,03mg/Kg n=8; 0,3mg/Kg= 8) dez minutos antes das avaliações comportamentais. Animais controle receberam salina (n=9). O Alprazolam (4mg/Kg n= 8) foi administrado 30 minutos antes das avaliações. Os animais foram submetidos às avaliações comportamentais, iniciando-se pelo LTE, seguindo-se pelo Campo Aberto e Transição Claro-Escuro, sempre com 30 segundos de intervalo entre os testes. Esse conjunto de avaliações foi repetido 24 horas depois.

Experimento 2-- - Tratamento Subcrônico com Buprenorfina (0,3mg/Kg)

A Buprenorfina foi injetada IP (0,3mg/Kg n=10) por três dias consecutivos em horário padronizado, sendo o terceiro dia injetada dez minutos antes das avaliações comportamentais. Animais controle receberam salina (n=8). Os animais foram submetidos às avaliações comportamentais, iniciando-se pelo LTE, seguindo-se pelo Campo Aberto e Transição Claro-Escuro, sempre com 30 segundos de intervalo entre os testes.

Experimento 3 - Tratamento agudo com Buprenorfina (0,3mg/Kg) associado ao tratamento subcrônico com Fluoxetina (10mg/Kg)

A Fluoxetina foi administrada por via intraperitoneal (10mg/Kg), subcronicamente por 3 dias. No dia da avaliação, 20 minutos após injeção de Fluoxetina, os animais receberam a Buprenorfina (0,3mg/Kg), dez minutos antes das avaliações comportamentais. Animais controle receberam veículo Tween 80 dissolvido em solução salina. Todos os grupos foram constituídos por 10 animais. Posteriormente foram submetidos às avaliações comportamentais, iniciando-se pelo LTE, seguindo-se pelo Campo Aberto e Transição Claro-Escuro, sempre com 30 segundos de intervalo entre os testes.

3. Resultados

Experimento 1 – Tratamento agudo com Buprenorfina nas doses 0,015 mg/Kg, 0,03mg/Kg, 0,3mg/Kg , tendo como parâmetro o Alprazolam 4mg/Kg : avaliação imediata e 24 horas depois

Labirinto em T Elevado

Esquivas

Na análise do efeito da Buprenorfina sobre as esquivas inibitórias no LTE (Figura 1), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve efeito do tratamento [$F_{(4,36)}=10,44$; $p<0,001$], houve efeito das repetições [$F_{(2,72)}=20,66$; $p<0,001$] e interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(8,72)}=5,64$; $p<0,001$]. O teste de Duncan apontou que houve aprendizagem nos animais controles ($p<0,05$). Animais do Grupo Controle na E2 foram diferentes de todos os demais. O Alprazolam e a Buprenorfina em todas as doses estudadas causaram diminuição nas esquivas inibitórias na E1 ($p<0,05$) e E2 ($p<0,001$), sem modificar a LB. Em contrapartida, na reexposição 24 horas após o primeiro teste, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito do tratamento [$F_{(4,34)}=2,40$; $p=0,069$], houve efeito das repetições [$F_{(2,68)}=9,32$; $p<0,001$], mas não se constatou interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(8,68)}=0,64$; $p=0,740$]. O teste de Duncan mostrou que não houve diferenças entre as esquivas em animais controles, pois devido a repetição do teste a LB e as demais esquivas foram altas. Verificou-se prejuízo da esquiva somente em decorrência do tratamento com Alprazolam e apenas na E1 ($p<0,05$). A dose de 0,3mg/Kg de Buprenorfina causou diminuição na latência de saída do braço fechado somente na LB ($p<0,05$).

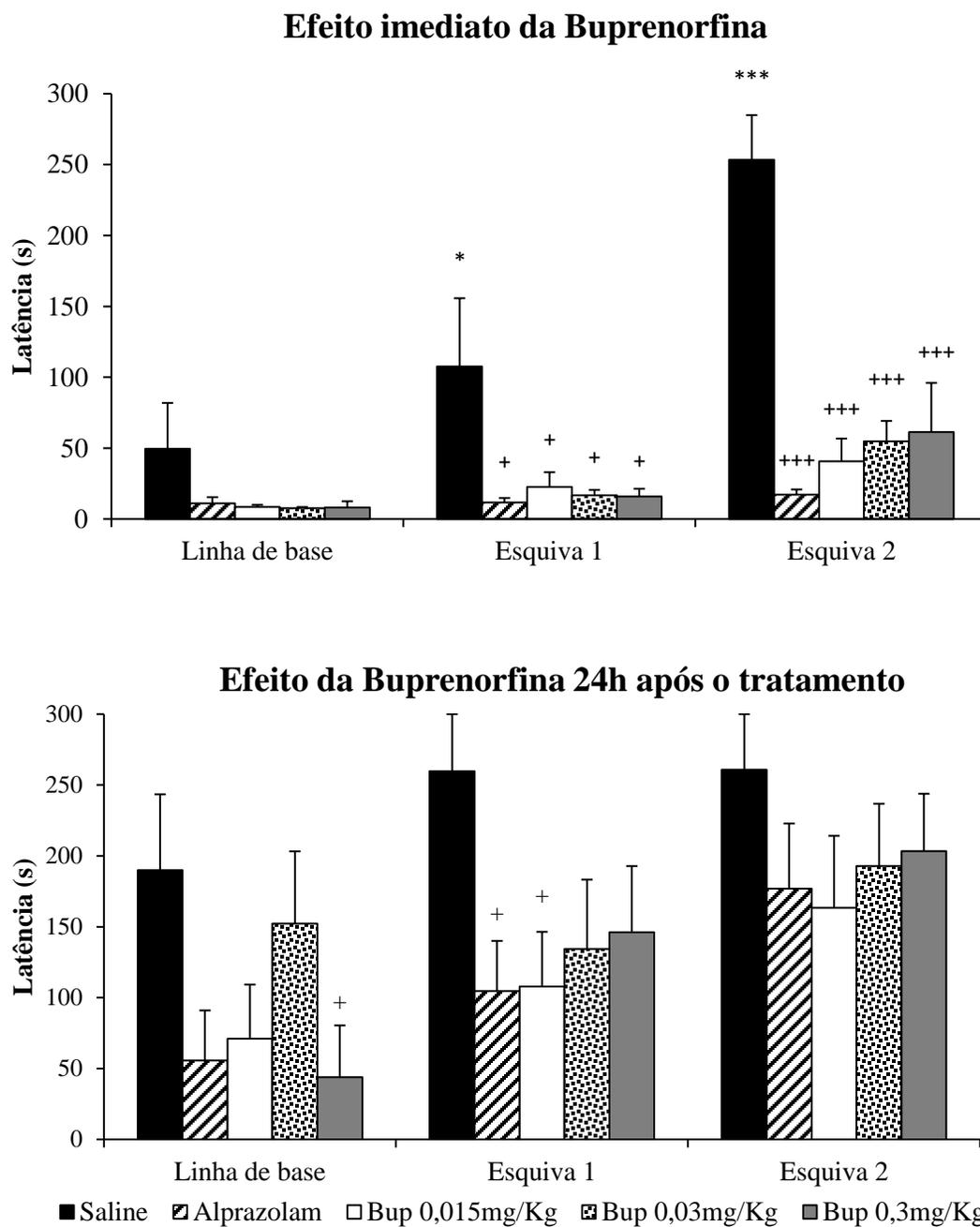


Figura 1. Média+EPM das latências em segundos de Esquivas no LTE, imediatamente e 24 horas após a injeção, na reexposição ao teste, apresentada por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg e por animais do grupo controle. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ representam as diferenças em relação à linha de base no mesmo grupo e + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$ representam diferenças para com o grupo controle. Parte superior: Teste; Parte inferior: reexposição ao LTE 24 horas após o teste.

Fugas

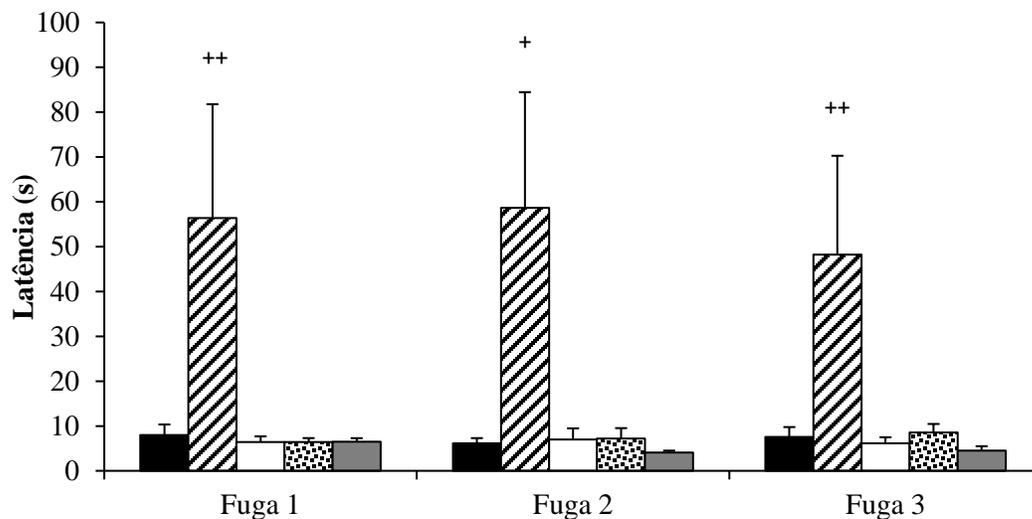
Quando se analisou as fugas (Figura 2) foi possível perceber que houve efeito do tratamento [$F_{(4,36)}=5,93$; $p<0,001$], não houve efeito das repetições [$F_{(2,72)}=0,03$; $p=0,961$], e não se constatou interação entre os fatores [$F_{(8,72)}=0,06$; $p=0,999$]. O teste de Duncan apontou que animais tratados com Alprazolam foram diferentes de todos os demais nas diferentes fugas ($p<0,05$).

Na reexposição não se evidenciou efeito do tratamento [$F_{(4,34)}=1,94$; $p=0,125$], nem efeito das repetições controles nas diferentes fugas [$F_{(2,68)}=1,53$; $p=0,223$], como também não se constatou interação entre os fatores [$F_{(8,68)}=1,86$; $p=0,082$]. No entanto, chama a atenção o comportamento de animais tratados com Buprenorfina 0,03mg/Kg na Fuga 1, os quais permaneceram um tempo maior que os controles e demais animais dos outros grupos experimentais no braço aberto. Analisando separadamente esta fuga através da ANOVA de uma via foi possível detectar esta diferença [$F_{(4,34)}=3,23$; $p=0,024$]. Nesse caso, o teste de Duncan apontou diferença clara desse grupo para com todos os demais ($p<0,05$).

Campo Aberto

Analisando o número de quadrados percorridos no Campo Aberto pelos animais tratados com Buprenorfina, a ANOVA mostrou que não houve efeito do tratamento [$F_{(4,36)}=1,60$; $p=0,194$]. Na reexposição também não se verificou efeito dos tratamentos [$F_{(4,34)}=1,01$; $p=0,418$]. Esses dados podem ser visualizados através da Figura 3.

Efeito imediato da Buprenorfina



Efeito da Buprenorfina 24h após a injeção

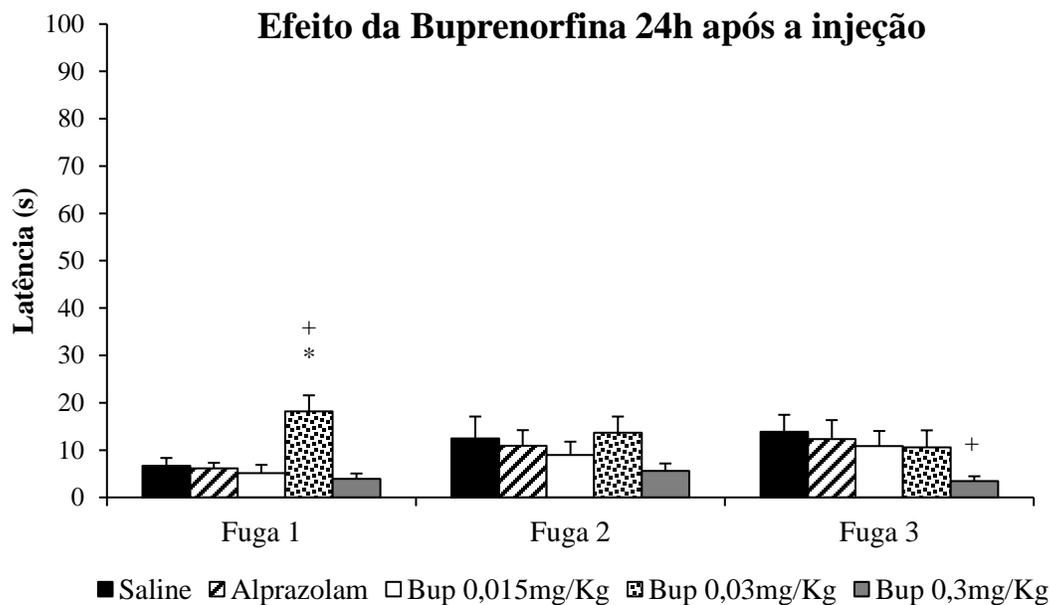


Figura 2. Média+EPM das latências em segundos de Fugas no LTE, imediatamente e 24 horas após a injeção, na reexposição ao teste, apresentada por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg e por animais do grupo controle. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan: * $p < 0,05$ representa diferenças em relação aos demais grupos na avaliação da Fuga 1 e + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ representam diferença para com o grupo controle. Parte superior: Teste; Parte inferior: reexposição ao LTE 24 horas após o teste.

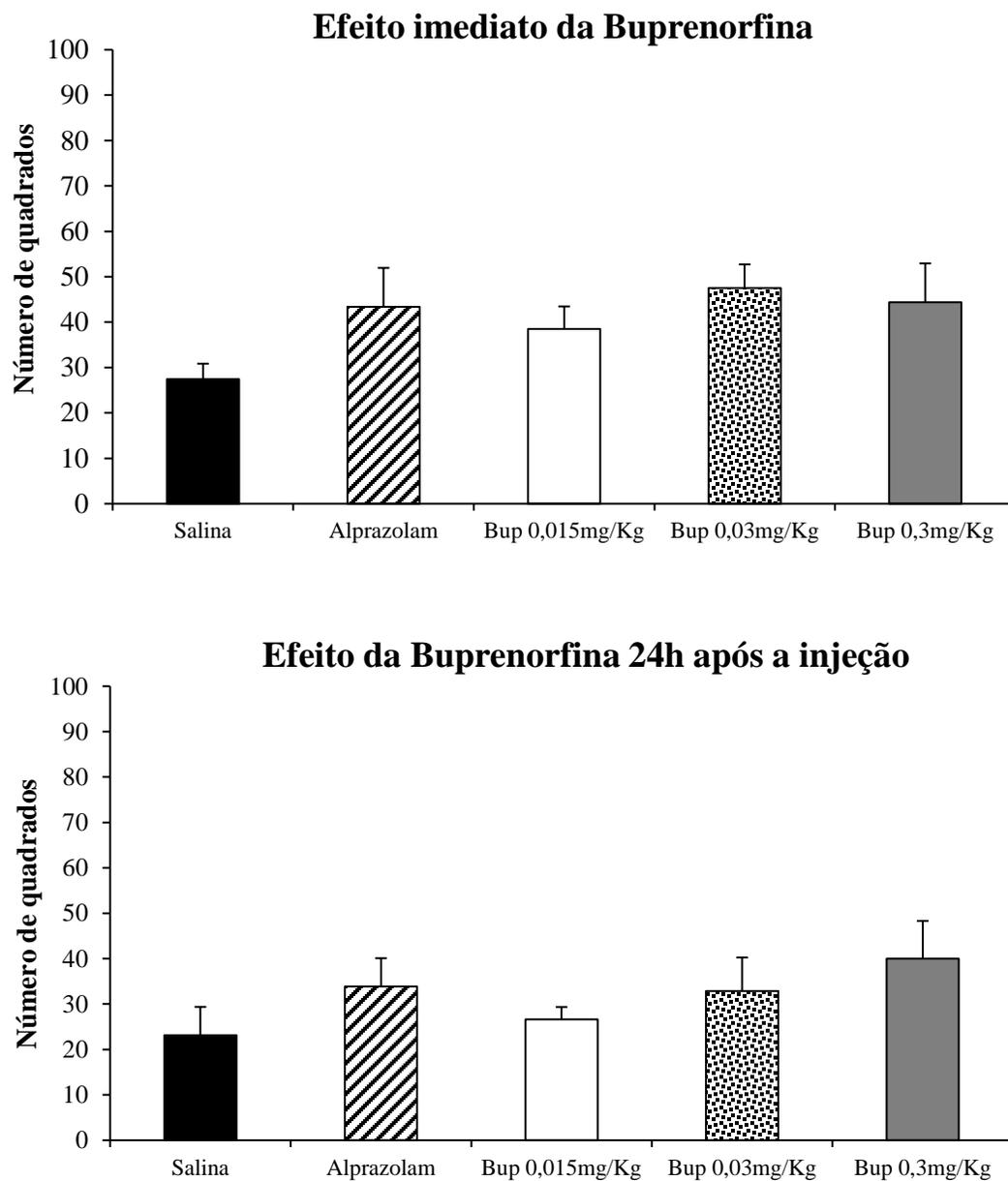


Figura 3 Média+EPM do número de quadrados percorridos no Campo Aberto, imediatamente e 24 horas após a injeção, na reexposição ao teste, apresentada por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg e por animais do grupo controle. Parte superior: Teste; Parte inferior: reexposição ao LTE 24 horas após o teste.

Teste de Transição Claro-Escuro

No Teste de Transição Claro-Escuro, não se constatou efeito dos tratamentos quando se analisou o tempo de latência para saída do lado claro [$F_{(4,34)}=0,52$; $p=0,527$], tempo de permanência no compartimento claro [$F_{(4,36)}=2,17$; $p=0,092$] e espreita [$F_{(4,36)}=0,46$; $p=0,761$], mas houve efeito do tratamento nas transições [$F_{(4,36)}=5,42$; $p=0,002$] e nos quadrados percorridos [$F_{(4,35)}=4,84$; $p=0,003$]. Curiosamente, animais tratados com Buprenorfina na dose de 0,03mg/Kg apresentaram aumento nas transições e no número de quadrados percorridos nesse teste ($p<0,01$), lembrando que esses mesmos animais apresentaram aumento na latência para saída do braço aberto, ou seja, prejuízo na Fuga 1, conforme descrito acima. Na reexposição também não se constatou efeito dos tratamentos sobre os comportamentos avaliados: latência de saída do lado claro [$F_{(4,34)}=2,79$; $p=0,042$], tempo de permanência no compartimento claro [$F_{(4,34)}=1,65$; $p=0,183$]; espreita [$F_{(4,34)}=0,94$; $p=0,452$]; transições [$F_{(4,34)}=2,53$; $p=0,058$]; quadrados percorridos [$F_{(4,34)}=2,58$; $p=0,054$]. No entanto, pode-se verificar que nessas duas últimas variáveis, transições e quadrados, o valor de p foi fronteiro. De fato, o teste de Duncan apontou que os animais tratados com Buprenorfina 0,03mg/Kg apresentaram aumento do número de quadrados percorridos em relação aos demais grupos e aumento das transições em relação aos animais tratados com Alprazolam e Buprenorfina 0,015mg/Kg ($p<0,05$), quando avaliados imediatamente após a injeção. Todos esses dados podem ser visualizados através das Figuras 4 e 5.

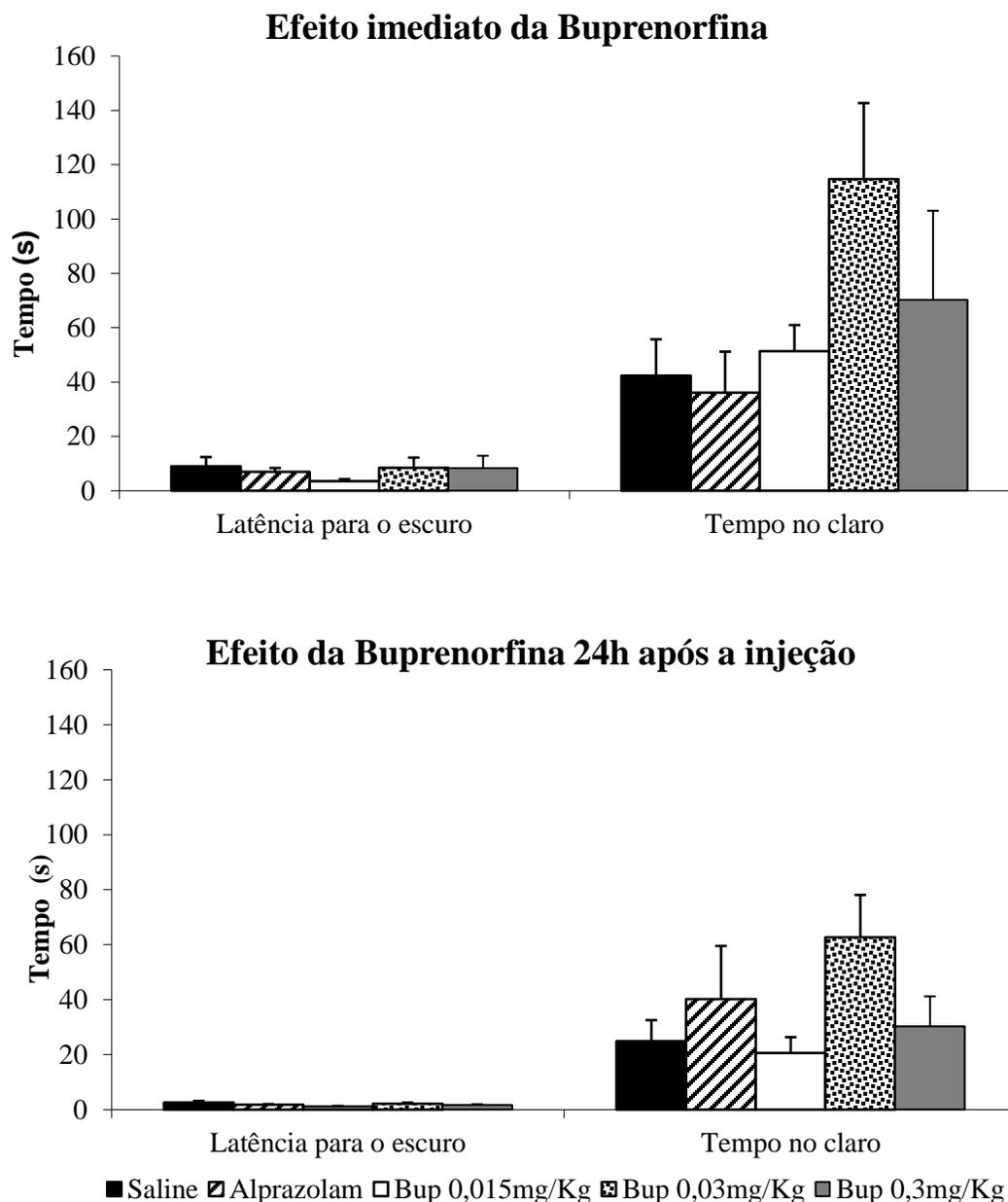


Figura 4. Média+EPM do tempo em segundos para saída do lado claro, como também de permanência no lado claro do teste apresentado por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg e por animais do grupo controle. Teste *post hoc* de Duncan: * $p < 0,05$ representa diferença para com o grupo tratado com Alprazolam; *f* fronteiroço ($p = 0,06$) representa diferença em relação ao grupo controle. Parte superior: Teste; Parte inferior: reexposição ao Teste de Transição Claro-Escuro 24 horas após o teste.

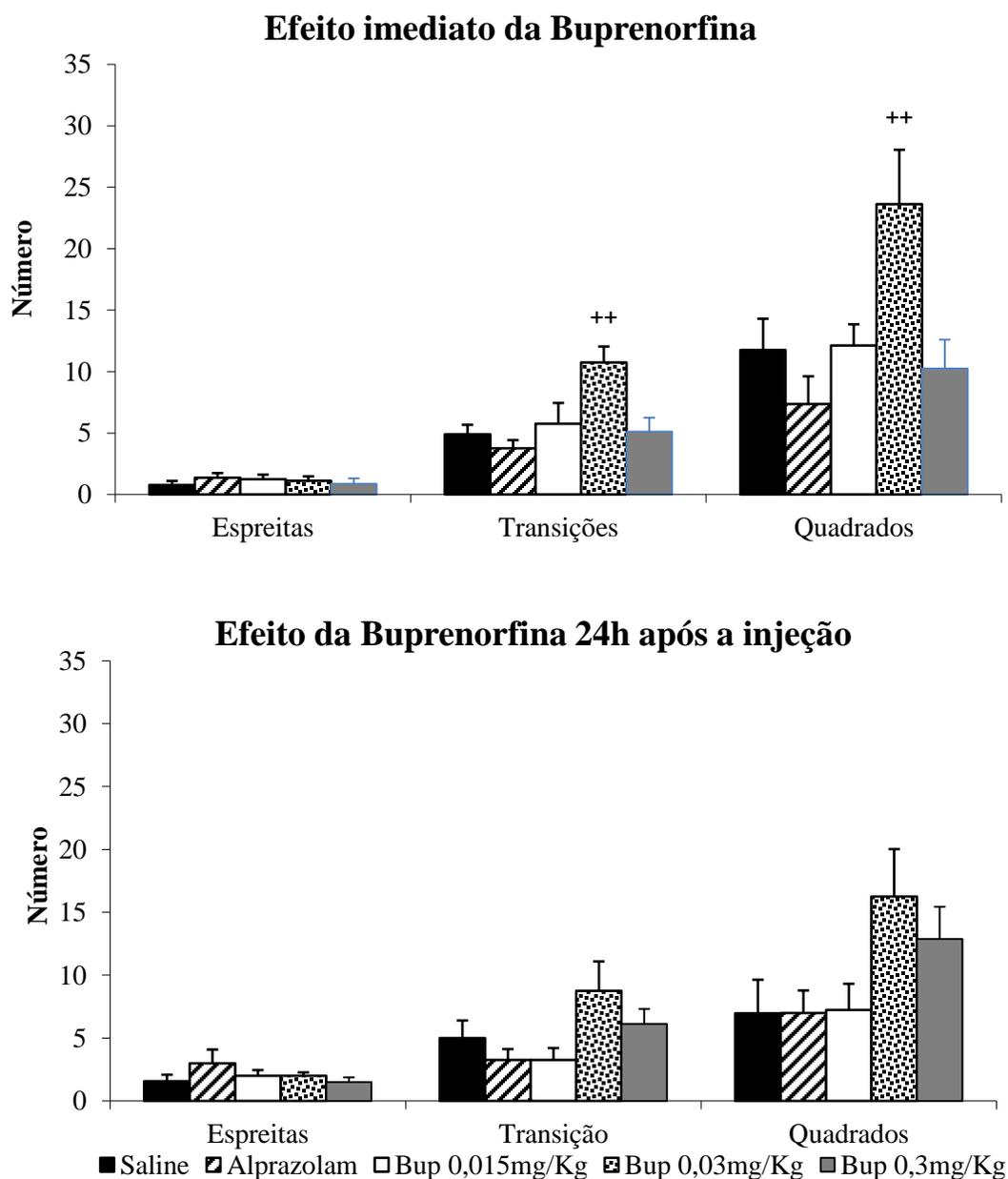


Figura 5. Média+EPM do número de tentativas (espreitas), de transições e de quadrados percorridos no lado claro no Teste de Transição Claro-Escuro apresentado por animais tratados com Buprenorfina nas doses de 0,015mg/Kg, 0,03mg/Kg e 0,3mg/Kg e por animais do grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Duncan: $^+p < 0,05$ e $^{++}p < 0,01$ representam diferenças para com o grupo controle.

Experimento 2 - Tratamento Subcrônico com Buprenorfina (0,3mg/Kg)

Labirinto em T Elevado

Esquivas

Quanto à apresentação das esquivas no LTE (Figura 6) a ANOVA de medidas repetidas mostrou que ocorreu efeito do tratamento [$F_{(1,16)} = 7,16$; $p = 0,016$], houve efeito das repetições [$F_{(2,32)} = 17,73$; $p = 0,001$], mas não se verificou interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(2,32)} = 1,69$; $p = 0,200$]. O teste de Duncan apontou que houve aumento na latência das esquivas apresentadas pelos animais controles, caracterizando uma curva de aprendizagem ($p < 0,05$). Mostrou também que a Buprenorfina diminuiu a latência da E1 e da E2 ($p < 0,05$).

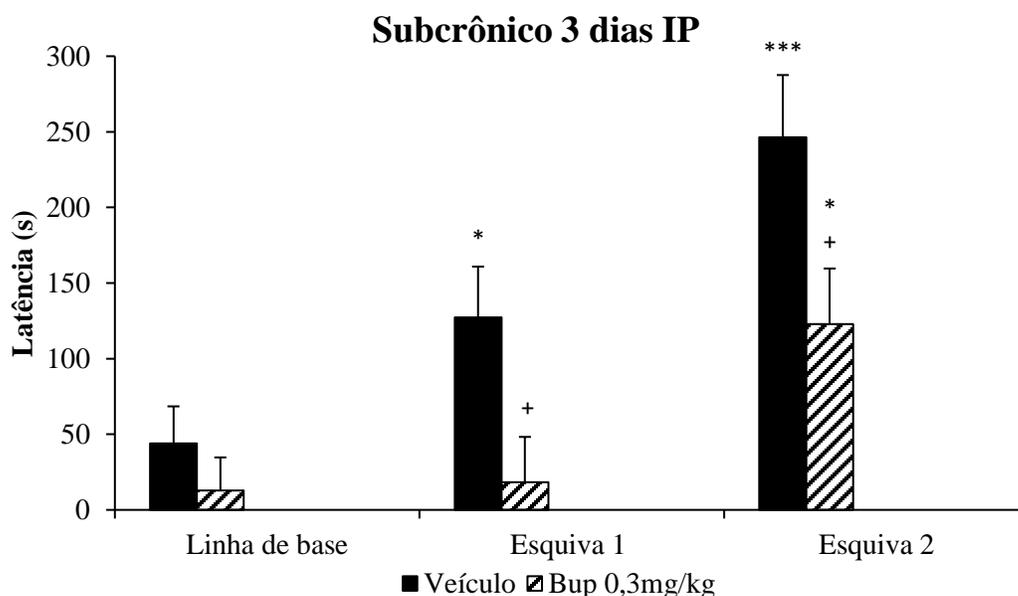


Figura 6. Média±EPM das latências em segundos das esquivas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento subcrônico com Buprenorfina e seus controles. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ representam diferenças em relação à linha de base no mesmo grupo e + $p < 0,05$ representa a diferença para o grupo controle.

Fugas

Não se constatou efeito da Buprenorfina sobre as fugas nem no tratamento [$F_{(1,16)}=0,36$; $p=0,550$], assim como também não se constatou efeito das repetições [$F_{(2,32)}=0,37$; $p=0,690$] e nem interação entre o tratamento e os grupos [$F_{(2,32)}=0,60$; $p=0,560$] (Figura 7).

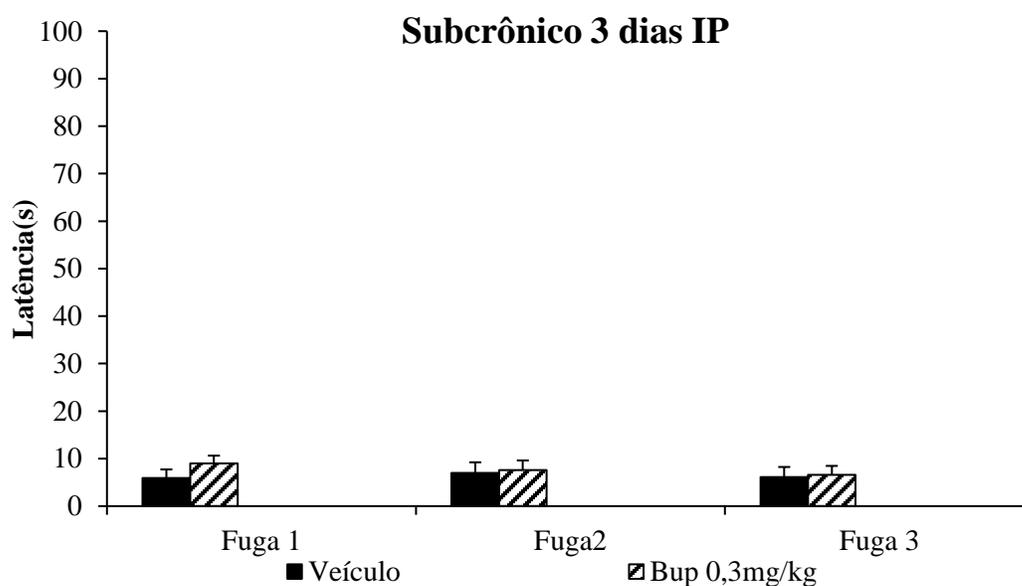


Figura 7. Média±EPM das latências em segundos das fugas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento subcrônico com Buprenorfina e seus controles.

Campo aberto

Analisando o número de quadrados percorridos no Campo Aberto pelos animais tratados subcrônico de Buprenorfina (Figura 8), a ANOVA mostrou que não houve diferenças em relação ao controle [$F_{(1,16)}=4,49$; $p=0,050$].

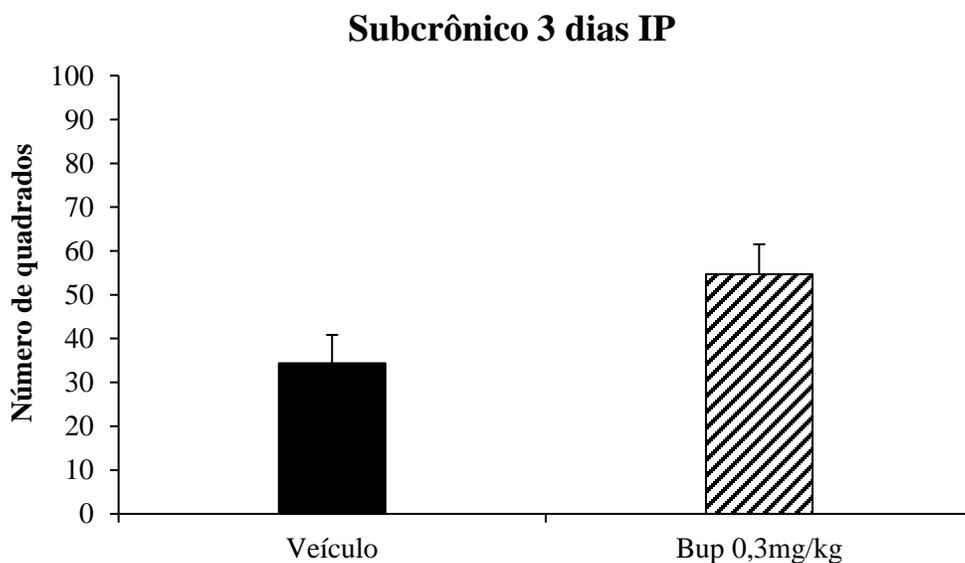


Figura 8. Média+EPM do número de quadrados percorridos no Campo Aberto por animais tratados com Buprenorfina na dose de 0,3mg/Kg, administrada subcronicamente e por animais do grupo controle.

Teste de Transição Claro-Escuro

No Teste de Transição Claro-Escuro (Figura 9), não se constatou efeito dos tratamentos em nenhuma das variáveis analisadas quando se analisou o tempo de latência para saída do lado claro [$F_{(1,14)}=0,31$; $p=0,580$], tempo de permanência no compartimento claro [$F_{(1,16)}=3,23$; $p=0,091$] e espreitas [$F_{(1,16)}=1,65$; $p=0,217$]. Não houve efeito do tratamento nas transições [$F_{(1,16)}=0,740$; $p=0,402$] e nos quadrados percorridos [$F_{(1,16)}=2,21$; $p=0,160$].

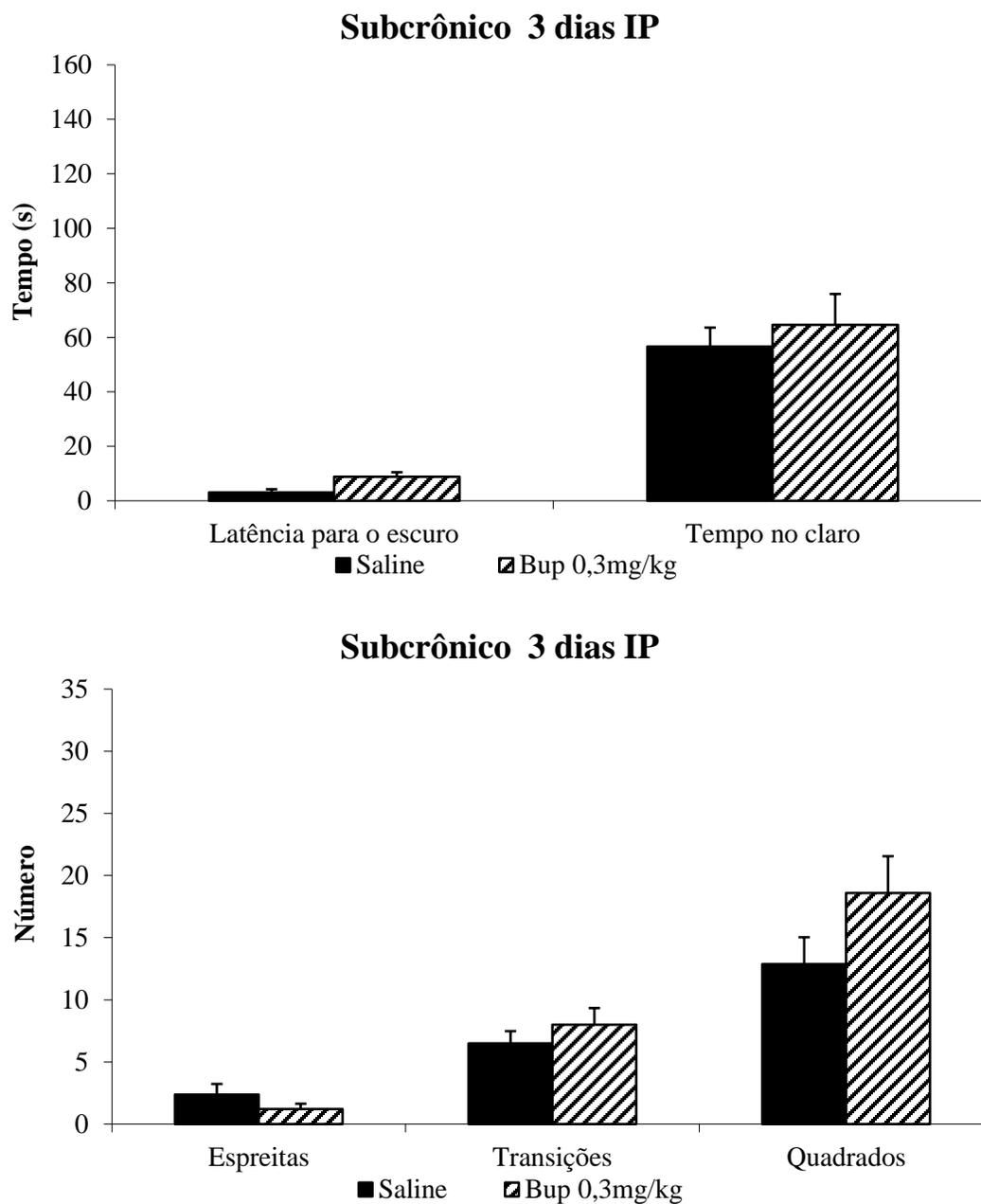


Figura 9. Média+EPM do tempo em segundos para saída o lado claro, como também de permanência no lado claro, do número de tentativas (espreitas), de transições e de quadrados percorridos apresentados por animais tratados com Buprenorfina na dose de 0,3mg/Kg administrada subcronicamente e por animais do grupo controle.

Experimento 3 - Tratamento agudo com Buprenorfina (0,3mg/Kg) associado ao tratamento subcrônico com Fluoxetina (10mg/Kg)

Labirinto em T Elevado

Esquivas

Quanto à apresentação das esquivas no LTE (Figura 10) a ANOVA de medidas repetidas mostrou que ocorreu efeito do tratamento [$F_{(3,36)}=3,23$; $p=0,030$], houve efeito das repetições [$F_{(2,72)}=33,03$; $p=0,001$] e verificou interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(6,72)}=9,68$; $p=0,001$]. O teste de Duncan apontou que houve aumento na latência das esquivas apresentadas pelos animais controles ($p<0,001$) e pelos animais do grupo Fluoxetina + veículo ($p<0,001$) caracterizando uma curva de aprendizagem. Mostrou também que a Buprenorfina + Veículo diminuiu a latência da E2 ($p<0,05$) em relação ao grupo veículo. O grupo que foi tratado com Fluoxetina + Buprenorfina diminuiu a latência da E2 em relação ao grupo Controle Veículo+Veículo ($p<0,01$) e em relação ao grupo Fluoxetina + Veículo ($p<0,05$).

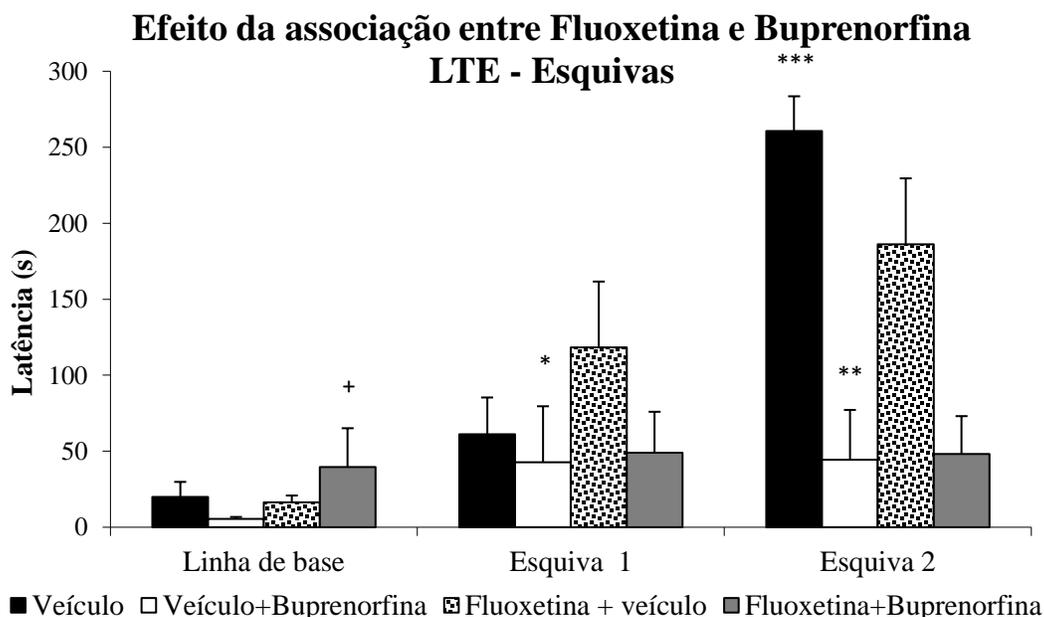


Figura 10 . Média±EPM das latências em segundos das esquivas no LTE apresentadas por animais submetidos ao tratamento com Buprenorfina 0,03mg/Kg, associado ao tratamento subcrônico de 3 dias com Fluoxetina 10mg/Kg, e seus controles. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ representam as diferenças em relação à linha de base no mesmo grupo; ++ $p<0,05$ representa a diferença para com o grupo controle.

Fugas

Não se constatou efeito da Buprenorfina sobre as fugas no tratamento [$F_{(3,39)}=2,44$; $p=0,070$], assim como também não se constatou efeito das repetições [$F_{(2,76)}=2,39$; $p=0,090$] e nem interação entre o tratamento e os grupos [$F_{(6,76)}=0,85$; $p=0,530$] (Figura 11).

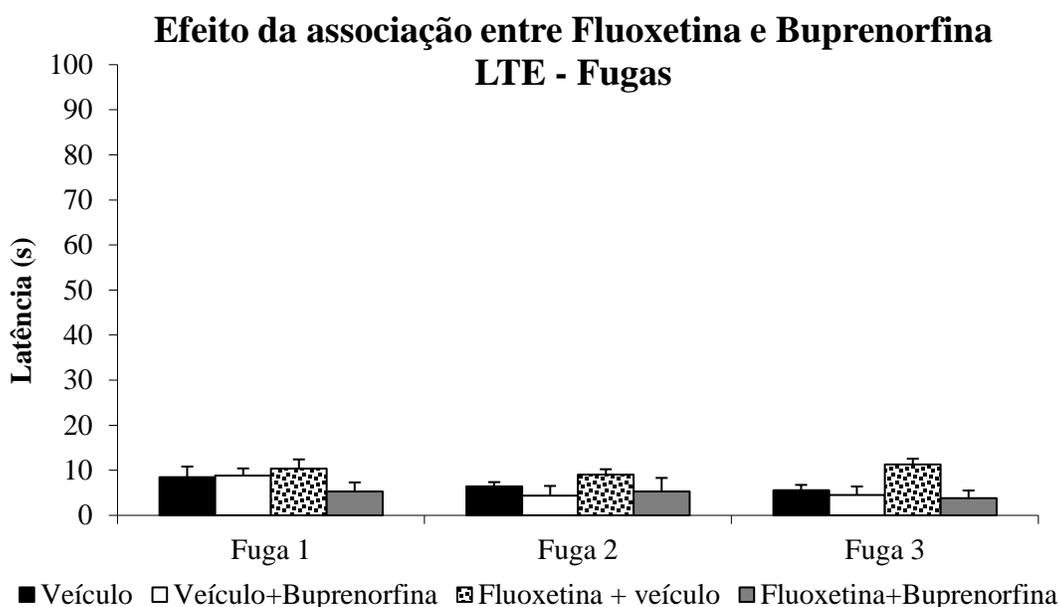


Figura 11. Média±EPM das latências em segundos das fugas no LTE, apresentadas por animais submetidos ao tratamento com Buprenorfina 0,3mg/Kg, em associação com o tratamento subcrônico com Fluoxetina 10mg/Kg, e seus controles.

Campo Aberto

Analisando o número de quadrados percorridos no Campo Aberto pelos animais tratados com Buprenorfina (Figura 12), a ANOVA mostrou que houve diferenças em relação ao controle [$F_{(3,38)}=22,39$ $p=0,001$]. O teste de Duncan mostrou que houve diferença grupo Fluoxetina + Veículo em relação ao grupo controle ($p<0,01$) e entre o grupo Fluoxetina+ Buprenorfina em relação ao grupo controle ($p<0,001$)

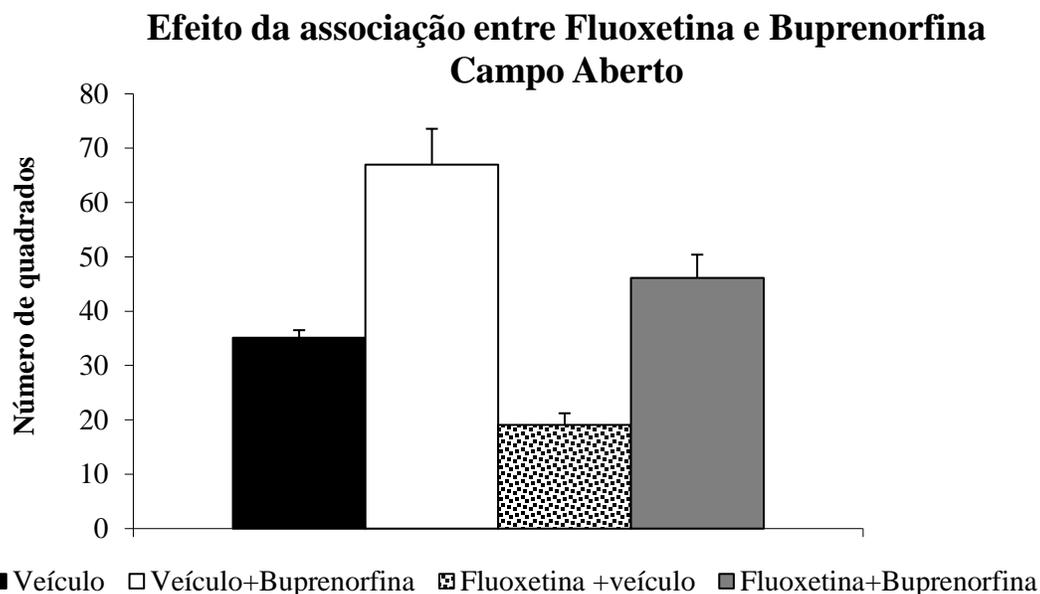


Figura 12. Média+EPM do número de quadrados percorridos no Campo Aberto por animais tratados com Buprenorfina 0,3mg/Kg, em associação com o tratamento subcrônico com Fluoxetina 10mg/Kg, e por animais do grupo controle.

Teste de Transição Claro-Escuro

No Teste de Transição Claro-Escuro, não se constatou efeito dos tratamentos quando se analisou o tempo de latência para saída do lado claro [$F_{(3,38)} = 0,12$ $p=0,940$], o tempo de permanência no compartimento claro [$F_{(3,38)}=3,90$; $p=0,010$] e as espreitas [$F_{(3,38)}=6,10$; $p=0,001$]. Não houve efeito do tratamento quando se analisou as transições [$F=7,48$; $p=0,005$] e os quadrados percorridos [$F_{(3,38)}=7,14$; $p<0,001$].

Efeito da associação entre Fluoxetina e Buprenorfina Teste de Transição Claro-Escuro

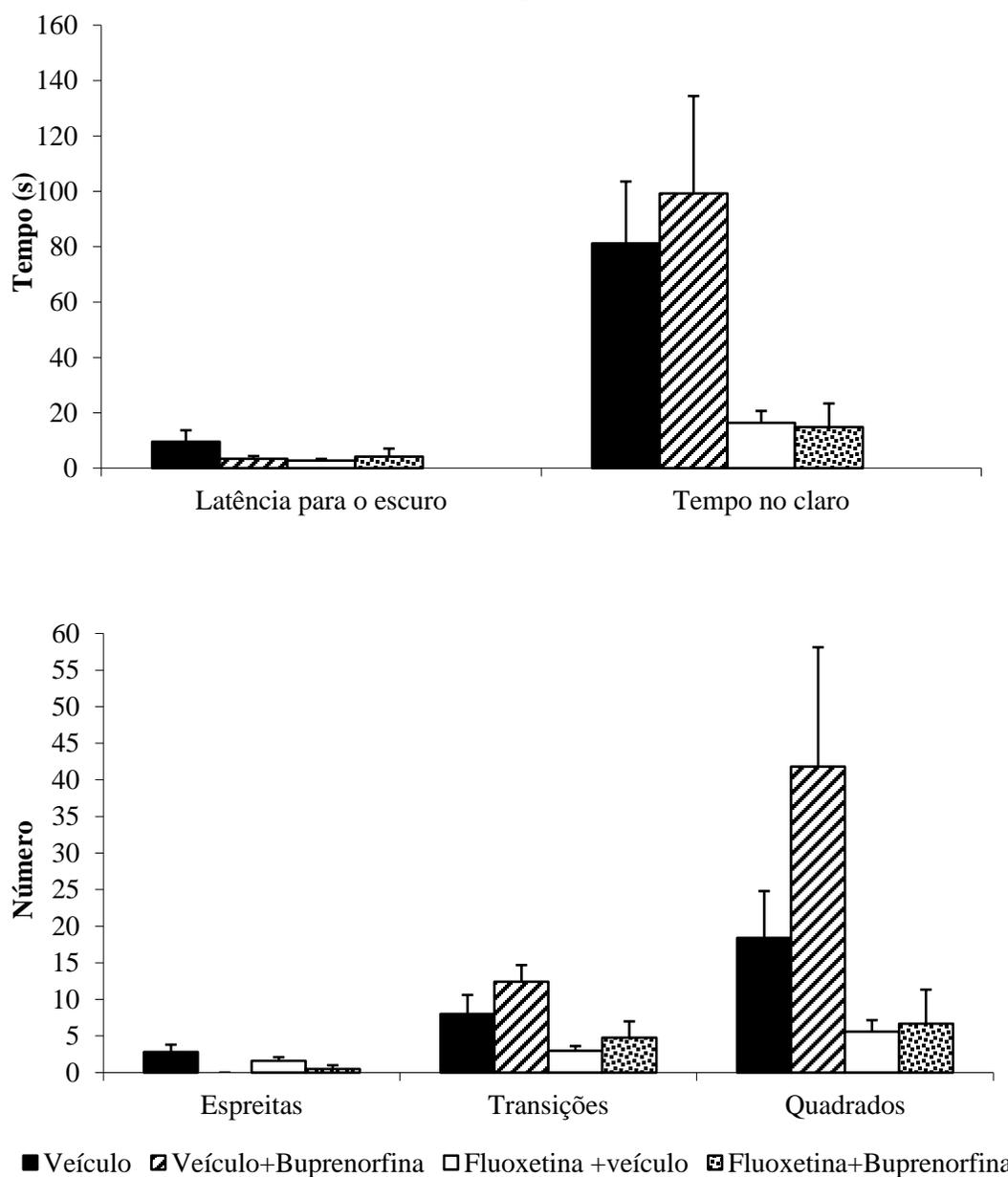


Figura 13. Média+EPM do tempo em segundos para saída do lado claro, como também de permanência no lado claro, do número de tentativas (espreitas), de transições e de quadrados percorridos, apresentado por animais tratados com Buprenorfina na dose de 0,3mg/Kg, associada à Fluoxetina 10mg/Kg, e por animais do grupo controle.

4. Discussão

Quanto ao LTE, nos três experimentos, os animais controles apresentaram um aumento da latência nas esquivas da Linha de Base à Esquiva 2, caracterizando uma curva esperada, que representa um comportamento de evitação a ambientes aversivos. Não se constatou qualquer modificação nas fugas nos animais controles. Esses resultados em conjunto mostram que as condições do teste foram totalmente controladas, já que os dados obtidos estão em consonância com o que se constatou em outros laboratórios utilizando esse mesmo teste (Graeff et al., 1993; Pobbe et al., 2014; Poltronieri et al., 2003; Roncon et al., 2013; Sant'ana et al., 2016; Zanoveli et al., 2007). Houve um nítido efeito ansiogênico quando os animais controles foram reexpostos ao aparato utilizado no teste 24h depois do teste, resultado este visível apenas quando se avaliou as esquivas, que se apresentaram aumentadas, prejudicando a curva de aprendizagem esperada. Esses resultados foram identificados em estudo prévio realizado em nosso laboratório (Baleotti, 2017). O mesmo se observou quando o comportamento motor dos animais controles foi avaliado no Campo Aberto e no Teste de Transição Claro-Escuro, ou seja, os resultados obtidos são consoantes ao que se constatou em outras pesquisas.

O Alprazolam, um agonista de receptores GABA, foi utilizado como um controle positivo para o efeito ansiolítico e antipânico, comprovando as constatações em outras investigações (Brandão; Graeff, 2012; Graeff; De Bortoli et al., 2006, 2008; Guimarães, 2012; Mitte et al., 2005; Sant'Ana et al., 2016; Zangrossi e Graeff, 2012; Zanoveli et al., 2005; 2007 e 2010). De fato, o Alprazolam causou o efeito esperado, diminuindo as esquivas e aumentando as fugas, efeitos esses identificados como, respectivamente, ansiolítico e panicolítico. O Alprazolam não afetou a atividade motora dos animais, e não causou modificação no Teste de Transição Claro-Escuro. Quando os animais tratados com Alprazolam foram avaliados 24 horas após o teste não se observou nenhuma modificação comportamental em nenhum dos 3 experimentos. A explicação científica para este aspecto é que este fármaco tem um tempo de meia vida de cerca de 11,4 horas nos indivíduos saudáveis. A concentração plasmática no homem tem um pico de uma ou duas horas após a ingestão, quando 70% a 80 % de Alprazolam liga-se às proteínas plasmáticas no sangue circulante, sendo metabolizado no fígado, originando o metabolito hidroxialprazolam que possui metade da ação do Alprazolam (Goodman e Gilman, 2005; Mandrioli et al., 2008). Provavelmente nos roedores deve haver uma diferença para este perfil, já

que 30 minutos após a ingestão observou-se nítido efeito ansiolítico e panicolítico. No entanto, logo depois, no Teste de Transição Claro-Escuro este efeito não mais se evidenciou.

A avaliação do efeito imediato da Buprenorfina em doses baixas mostrou maior efetividade deste fármaco em possibilitar efeito ansiolítico do que doses mais altas testadas, avaliadas em experimento anterior realizado por outra pesquisadora de nosso laboratório (Baleotti, 2017). Nesse experimento prévio, além do efeito ansiolítico foi evidenciado também aumento de atividade motora, dificultando a interpretação dos resultados, o que não se constatou nos resultados atuais.

No estudo apresentado por Falcon et al. (2015), a Buprenorfina foi administrada em camundongos machos avaliados no Teste do Nado Forçado e ao teste da Hipofagia induzida pela novidade, com o objetivo de avaliar, respectivamente, comportamentos defensivos relacionados com a depressão e coma ansiedade. A Buprenorfina foi injetada por via intraperitoneal em 3 doses, sendo que a dose efetiva foi 0,25mg/kg, produzindo reduções significativas na imobilidade no nado forçado e na latência da aproximação do alimento no teste da Hipofagia, 24 horas após a administração. Efeitos similares foram observados na administração crônica ao longo de 6 dias, cuja avaliação foi introduzida, pois na clínica o que se utiliza são os adesivos, que disponibilizam o fármaco gradualmente, ao longo de 7 dias. Glover (2008) demonstrou os efeitos da Morfina e Buprenorfina administradas cronicamente e foram avaliados, na tolerância, tolerância cruzada e retirada dos fármacos, no intuito de avaliar a abstinência desses fármacos no teste de sobressalto potencializado pelo medo e do pré-tratamento com Naloxona. Os testes foram realizados em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley. Os fármacos foram administrados por via subcutânea em diferentes doses, visando também avaliar a significância da curva dose-efeito. As curvas mostraram que a Buprenorfina é 40 vezes mais potente que a da Morfina. A Naloxona reverteu esses efeitos. A Morfina e a Buprenorfina mostraram tolerância cruzada em seus efeitos ansiolíticos e analgésicos sugerindo um receptor comum que desencadeiam seus efeitos.

Na presente investigação constatou-se prejuízo nas esquivas, efeito este reconhecido como efeito ansiolítico da Buprenorfina, tanto na avaliação aguda como na subcrônica, mas sem afetar as fugas. Em nenhuma dessas situações houve aumento de atividade motora. No entanto, diferentemente dos estudos relatados acima, não houve ansiólise 24 h após o tratamento. Somente a maior dose afetou a primeira esquiva (LB), o que não permite a afirmação de que

houve alteração no padrão comportamental que levasse a pensar em diminuição da ansiedade. Convém ressaltar, que muito embora tenha se averiguado uma tendência, os resultados da Buprenorfina no LTE não foram reproduzidos no Teste de Transição Claro-Escuro, ou seja, não se constatou ansiólise nesse teste.

A análise dos dados referentes ao experimento onde a Buprenorfina foi administrada em baixas doses, mostrou que a melhor dose administrada foi de 0,3mg/Kg, pois a dose intermediária, mesmo apresentando um dado relacionado com o efeito anti-pânico, teve um perfil conflitivo, já que no Teste do Claro-Escuro causou aumento de atividade motora.

Alguns aspectos precisam ser destacados nessa análise: Esperava-se um efeito tardio da Buprenorfina. Segundo Hang e Dale (2004), a Buprenorfina apresenta duração de ação longa. A ligação da Buprenorfina a receptores μ -opioides é lenta, comparada ao mecanismo de ligação com outros receptores. A dissociação lenta deste fármaco a partir dos resultados da interação entre a Buprenorfina e o receptor e a longa duração do efeito, é vantajosa na retirada do medicamento, diminuindo os efeitos de abstinência, devido ao tempo que o fármaco demora para desligar-se do receptor. Pesquisas têm demonstrado que a Buprenorfina se dissocia de forma lenta dos receptores, possuindo curva dose-efeito em forma de sino, onde a dose efetiva ED50, proporciona maior eficácia e segurança em relação aos efeitos colaterais e ao risco de dependência física, diferentemente da característica linear da curva da Morfina (Likar, 2006); Ainda Assim, é provável que o efeito ansiolítico observado tenha sido possibilitado pelo antagonismo κ (Falcon et al., 2015; Glover e Davis, 2008; Karp et al., 2014; Likar, 2006; Virk et al., 2009; Yamamoto et al., 2006).

O efeito ansiolítico evidenciado em decorrência do tratamento com a Buprenorfina encontra sustentação em inúmeras pesquisas prévias que vêm se acumulando e fortalecendo a área (Anseloni et al., 1999; Coimbra et al., 1996; Coimbra; Brandão, 1997; Coimbra et al., 2000; Motta; Brandão, 1993; Motta; Penha; Brandão, 1995; Nobre et al., 2000).

Utilizando também o LTE, Roncon e colaboradores (2013), mostraram que a microinjeção intra-SCPD de morfina em ratos machos causou efeito panicolítico, que foi bloqueado pelo pré-tratamento local com a naloxona ou com o antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY-100635, mostrando haver uma interação entre as neurotransmissões serotoninérgicas e opioidérgica na SCPD. No mesmo sentido, foi mostrado ainda que o pré tratamento com naloxona bloqueou o efeito panicolítico promovido pelo agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-

DPAT, ambos microinjetados intra-SCPD. Ainda assim, o pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptores μ -opioide CTOP bloqueou o efeito anti-fuga do agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, quando microinjetados intra-SCPD. Complementarmente, o tratamento combinado de doses sub-eficazes do agonista seletivo de receptores μ - opióides DAMGO e de 8-OH-DPAT também causa efeito do tipo panicolítico no LTE.

Tais aspectos reforçam os dados obtidos e a hipótese do estudo. No entanto, como explicar o sinergismo constatado em decorrência da associação entre fluoxetina subcrônica e Buprenorfina aguda? Cussac et al. (2012) mostraram, em estudo *in-vitro* na SCP, que receptores 5-HT_{1A} e μ - opióides podem formar heterodímeros, isto é, formam complexos contendo os 2 receptores, podendo funcionar assim de maneira interdependente, o que justificaria a antecipação do efeito ansiolítico constatado. Isto é possível devido a uma complexidade funcional dos receptores opióides que pode conferir-lhes esta possibilidade de formação desses heterodímeros de receptores, dando origem a uma ampla diversidade farmacológica, cujas propriedades funcionais diferem dos receptores monoméricos (Hang e Dale, 2004).

Estudos prévios experimentais utilizando a Fluoxetina no LTE mostraram que a Fluoxetina inibiu o comportamento de fuga no Labirinto em T Elevado, apresentando um efeito semelhante ao panicolítico (Zanovelli et al., 2007) A Fluoxetina, um inibidor da recaptação de serotonina (ISRS), tem sido utilizada na prática clínica para tratamentos de transtornos de humor e ansiedade patológica como depressão e transtornos do pânico (Zanovelli et al., 2007). Sabe-se que a Fluoxetina produz seus efeitos entre 4 a 6 semanas, efeito tardio que pode ser indicativo de que alterações no sistema serotoninérgico são subjacentes à sua eficácia (Hensler, 2003). A demora da Fluoxetina em apresentar efeitos ansiolíticos pode colocar pacientes resistentes ao tratamento em risco devido uma exacerbação da ansiedade no início do tratamento (Falcon, 2015). No presente estudo a associação entre a Fluoxetina e a Buprenorfina antecipou o efeito ansiolítico, mas não afetou as respostas de fugas. Clinicamente esta associação seria um grande benefício, pois minimizaria os efeitos do ISRS em questão.

5. Conclusões

Conclui-se que a Buprenorfina, administrada de forma aguda e subcrônica, diminuiu a manifestação de comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada, e antecipou o efeito ansiolítico da Fluoxetina, confirmando parcialmente a hipótese proposta, já que não houve qualquer modificação nas respostas comportamentais relacionadas com o pânico.

Esses resultados permitem indicar que esta associação poderia se constituir em uma opção relevante no tratamento dos transtornos de ansiedade na clínica, devido à sua baixa capacidade de causar efeitos adversos e também diante da possibilidade de antecipar os efeitos benéficos da Fluoxetina.

6. Referências

Allen, D.I., Jhonson, A.E, Tempel, A., Zukin, R.S., Luine, V.N., McEwen, B.S., 1993. Serotonergic lesions decrease mu- and delta-opiate receptor binding in discrete areas of the hypothalamus and in the midbrain central Gray. *Brain. Res.* 625(2), 269-275.

Anseloni, V.C., Coimbra, N.C., Morato, S., Brandão M.L., 1999. A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Exp. Brain. Res.* 129(2), 260-268.

Artigas, F., Romero, L., De Montigny, C., Blier, P., 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends. Neurosci.* 19, 378-383.

Baldwin, D.S., Anderson, I.M., Nutt, D.J., Bandelow, B., Bond, A., Davidson, J.R., den Boer, J.A., Fineberg, N.A., Knapp, M., Scott, J., Wittchen, H.U., 2005. Evidence-Based Guidelines for The pharmacological Treatment of Anxiety Disorders: Recommendations from The British association For Psychopharmacology. *J. Psychopharmacol.* 19(6), 567-596.

Baleotti, M.E., 2017. Buprenorphine systemic effects on the modulation of defensive behaviors related to generalized anxiety and panic disorders. 2017. Master's dissertation (Bioscience) - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis. 103 pp.

Bodkin, J.A., Zornberg, G.L., Lukas, S.E., Cole, J.O., 1995. Buprenorphine treatment of refractory depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 15(1), 49 - 57.

Brandão, M.L., Graeff, F.G., 2014. *Neurobiologia Dos Transtornos Mentais*. Atheneu, São Paulo.

Brasil. Ministério Da Saúde. Portaria/SVS Nº 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial.

Diário Oficial da União, Brasília, D.F
Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29PRT_SVS_344_1998_COMP.pdf/f7c0dfd5-b16a-4077-b32c-d421f431c6e7>.

Coimbra, N.C., Brandão, M.L., 1997. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav. Brain. Res.* 87(1), 97-103.

Coimbra N.C, Eichenberger G.C.D, Gorchinski R.T, et al., 1996. Effects of the blockade of opioide receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. *Brain Res.* 736, 348-352.

Coimbra, N.C., Osaki, M.Y., Eichenberger, G.C.D., Ciscato, J.G.Jr, Jucá, C.E., Biojone, C.R., 2000. Effects of opioide receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Psychopharmacol. (Berl)*. 152, 422-430.

Cussac, D., Raully-Lestienne, I., Heusler, P., Finana, F., Cathala, C., Bernois, S., De Vries, L., 2012. M-Opioid and 5-Ht_{1a} Receptors Heterodimerize and Show Signalling Crosstalk Via G Protein and Map-Kinase Pathways. *Cell. Signalling.* 24(8), 1648-57.

De Bortoli, V.C., Nogueira, R.L., Zangrossi, H., 2006. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacol. (Berl)*. 183(4), 422-428.

De Bortoli, V.C., Nogueira, R.L., Zangrossi, H., 2008. Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT (1A) and 5-HT (2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacol. (Berl)*. 198(3), 341-349.

Falcon, E., Maier, K., Robinson, S.A., Hill-Smith, T.E., Lucki, I., 2015. Effects of buprenorphine on behavioral tests for antidepressant and anxiolytic drugs in rat. *Psychopharmacol.* 232,907-915.

Feng, Y., He, X., Yang, Y., Chao, D., Lazarus, L.H., Xia, Y., 2012. Current Research on Opioid Receptor Function. *Curr. Drug. Targets.* 13(2), 230-246.

Glover, E.M., Davis, M., 2008. Anxiolytic-like effects of morphine and buprenorphine in the rat model of fear-potentiated startle: tolerance, cross-tolerance, and blockade by naloxone. *Psychopharmacol.* 98, 167-180.

Goodman & Gilman, 2005. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Décima ed. McGraw-Hill, Rio de Janeiro.

Graeff, F.G., Viana, M.B., Tomaz, C., 1993. The elevated t maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26(1), 67-70.

Graeff, F.G., 1994. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(8),11-29.

Graeff, F.G., Netto, C.F., Zangrossi, H., 1998. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23(2), 237-246.

Graeff, F.G., Guimarães, F.S., Andrade, T.G.C.S., Deakin, J.F.W., 1996. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54(1), 129-141.

Graeff, F.G., 2003. *Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático*. Rev.

Bras.Psiquiatr. 25, 21-24.

Graeff, F.G., Hetem, L.A.B., 2012. Transtornos de Ansiedade. Segunda ed. Atheneu, São Paulo.

Hensler, J.G., 2003. Regulation of 5-HT_{1A} receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. *Life Sci.* 72(15), 1665-1682.

Hoffman, E.J., Mathew, S.J., 2008. Anxiety Disorders: A Comprehensive Review of Pharmacotherapies. *Mt. Sinai J. Med.* 75, 247-262.

Karp, J.F., Butters, M.A., Begley, A.E., Miller, M.D., Lenze, E.J., Blumberger, D.M., Mulsant, B.H., Reynolds, C.F.3rd., 2014. Safety, Tolerability, and Clinical Effect of Low-Dose Buprenorphine for Treatment-Resistant Depression in Midlife and Older Adults. *J. Clin. Psychiatry.* 75(8), 785-793.

Kishimoto, K., Koyama, S., Akaike, N., 2001. Synergistic μ -opioid and 5-HT_{1A} presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacol.* 41(5), 529-538.

Likar, R., 2006. Transdermal Buprenorphine in the management of persistent pain – safety aspects. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2(1), 115-125.

Mandrioli, R., Mercolini, L., Raggi, M.A., 2008. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective. *Curr. Drug Metab.* 9(8), 827-44.

Morgan, M.M., Whitney, P.K., Gold, M.S., 1998. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Res.* 804, 159-166.

Motta, V., Brandão, M., 1993. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44(1), 119-125.

Motta, V., Penha, K., Brandão, M.L., 1995. Effects of microinjections of μ and κ receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. *Psychopharmacol.* 120(4), 470-474.

Nobre, M.J., Ribeiro Dos Santos, N., Aguiar, M.S. Brandão, M.L., 2000. Blockade of μ - and activation of κ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behavior in rats tested in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 404(1-2), 145-151.

Otoni, E.B., 2000. A Tool for the Transcription and Timing of Behavior Pasternak G.W, Pan Y.X., 2013. Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept. *Pharmacol Rev.* 65(4), 1257-1317.

Pasternak, G.W., Pan, Y.X., 2013. Mu Opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol Rev.* 65(4), 1257-1317.

Poltronieri, S.C., Zangrossi, H., De Barros Viana, M., 2003. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav. Brain.Res.* 47(1-2), 185-192.

Roncon, R.M., Biesdorf, C., Coimbra, N.C., Audi, E.A., Zangrossi, H.Jr., Graeff, F.G., 2013. Cooperative regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors in the rat periaqueductal grey matter by 5-HT_{1A} and μ - receptors. *J. Psychopharmacol.* 27(12), 1141-1148.

Sant'Ana, A.B., Weffort, L.F., Sergio, T.O., Gomes, R.C., Frias, A.T., Matthiesen, M., Vilela-Costa, H.H., Yamashita, P.S., Vasconcelos, A.T., De Bortoli, V., Del-Ben, C.M., Zangrossi, H.Jr., 2016. Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 315, 115-122.

Teixeira, R.C., Zangrossi, H.Jr., Graeff, F.G., 2000. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 571-576.

Thanawala, V., Kadam, V.J., Ghosh, R., 2008. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Curr. Drug Targets.* 9(10), 887-894.

Tian, X.Z., Chen, J., Xiong, W., He, T., Chen, Q., 2009. Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. *Peptides.* 30(7), 1348-54.

Viana, M.B., Tomaz, C., Graeff, F.G., 1994. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49(3), 549-554.

Virk, M.S., Arttamangkul, S., Birdsong, W.T., Williams, J.T., 2009. Buprenorphine is a weak partial agonist that inhibits opioid receptor desensitization. *J. Neurosci.* 29(22), 7341-48.

Wheeler, A., Cowan, A., 1991. Buprenorphine and morphine cause antinociception by different transduction mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 195, 411-413.

Yamamoto, T., Shono, K., Tanabi, S., 2006. Buprenorphine activates mu and opioid receptor like-1 receptors simultaneously, but the analgesic effect is mainly mediated by mu receptor activation in the rat formalin test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(1), 206-213.

Zangrossi, H.Jr., Graeff, F.G., 1997. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull.* 44(1), 1-5.

Zanoveli, J.M., Nogueira, R.L., Zangrossi, H., 2007. Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacol.* 52(4), 1188-95.

Zanoveli, J.M., Pobbe, R.L., De Bortoli, V.C., Carvalho, M.C., Brandão, M.L., Zangrossi, H.Jr., 2010. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic Fluoxetine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13(8), 1079-88.

ANEXOS

ANEXO I – NORMAS DA REVISTA PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR

IMPACT FACTOR

2016: 2.748 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

IMPACT FACTOR.

2016: 2.748 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

<https://www.evise.com/evise/jrnl/PBB>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees (not from the same institution). Non-institutional emails (e.g., yahoo, gmail, qq, rediffmail, Hotmail etc.) are not encouraged. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

The accepted abbreviation for Pharmacology Biochemistry and Behavior for bibliographic citation is **PharmacolBiochemBehav**.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 8

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering, this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a

minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with a n editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors, you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate bacKground, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 9

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix,

Eq. (B.1) and so on. Similarly, for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title page. Include a title page in the Word file of your manuscript. The document containing your manuscript should contain the Title Page as Page 1.
- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 10

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be

sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formula

Formulas and Equations. Structural chemical formulas, process flow-diagrams, and complicated mathematical expressions should be kept to a minimum. Usually chemical formulas and flow-diagrams should be drawn in India ink for reproduction as line cuts. All subscripts, superscripts, Greek letters, and unusual characters must be clearly identified.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the

case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 11

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi

is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the

DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M.(2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>

Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper. Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 12

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/pharmacology-biochemistry-and-behavior>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in:

Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 13

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.

Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 14

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to MendeleyData. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data.

Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 250 USD is payable for publication in Data in Brief. This fee applies to articles submitted before 31 December 2017. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

ARTICLE ENRICHMENTS

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article.

AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

Additional information

As part of the submission process your paper may be screened for English language usage and conformity to the guide for authors before it reaches the review stage. This is to ensure the

journal's high standards are maintained and the review process is kept to a minimum. Passing this check is not a guarantee that your submission will subsequently proceed to the peer review process, which is a decision to be made at the sole discretion of the journal editor.

Drugs. Proprietary (trademarked) names should be capitalized. The chemical name should precede the trade, popular name, or abbreviation of a drug the first time it occurs. The manufacturer's name and location should be included in the text.

Anesthesia. In describing surgical procedures on animals, the type and dosage of the anesthetic agent should be specified. Curarizing agents are not anesthetics; if these were used, evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was employed.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

AUTHOR INFORMATION PACK 29 Oct 2017

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh 15

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For no extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from

Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO II - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto “**Efeito da buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores k-opioide, como agente anti-pânico**”, Registro nº 003/2015, sob responsabilidade da Pesquisadora **Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o Relatório Final deverá ser entregue impreterivelmente em abril/2017.

Assis, 10 de março de 2016.

Edislane Barreiros de Souza
Edislane Barreiros de Souza
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA