

MARIA EULÁLIA BALEOTTI

**EFEITO SISTÊMICO DA BUPRENORFINA NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM O
TRANSTORNO DA ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O PÂNICO**

**ASSIS
2017**

MARIA EULÁLIA BALEOTTI

**EFEITO SISTÊMICO DA BUPRENORFINA NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM O
TRANSTORNO DA ANSIEDADE GENERALIZADA E COM O PÂNICO**

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

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

**ASSIS
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B152e	<p>Baleotti, Maria Eulália</p> <p>Efeito sistêmico da Buprenorfina na modulação de comportamentos defensivos relacionados com o transtorno da ansiedade generalizada e com o pânico / Maria Eulália Baleotti. Assis, 2017. 99 f.il.</p> <p>Dissertação de Mestrado– Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Telma G. C. Spera de Andrade</p> <p>1. Receptores opioides. 2. Buprenorfina. 3. Transtorno de ansiedade generalizada. 4. Transtorno do pânico. 5 Labirinto em T Elevado. I. Andrade, Telma Gonçalves Carneiro Spera de. II. Título.</p> <p>CDD 616.852 230 6</p>
-------	--

MARIA EULÁLIA BALEOTTI

EFEITO SISTÊMICO DA BUPRENORFINA NA MODULAÇÃO
DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS
COM O TRANSTORNO DA ANSIEDADE GENERALIZADA E
COM O PÂNICO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP/Assis para a
obtenção do título de Mestrado Acadêmico em
BIOCIÊNCIAS (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 07/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: Profa. Dra. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade - UNESP/ASSIS



Membros: Profa. Dra. Camila Marroni Roncon - FEMA/ASSIS



Profa. Dra. Miriam Mendonça Morato de Andrade - UNESP/ASSIS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora, que até aqui me sustentaram pela fé.

À UNESP de Assis, seu corpo docente, em especial Prof. Dr. Pitagoras da Conceição Bispo, direção e administração que oportunizaram a minha formação.

À minha orientadora Profa. Dra. Telma pelo empenho dedicado na elaboração deste trabalho, por me orientar e por suas correções.

Meus respeitosos agradecimentos às professoras membros da banca de avaliação Dra. Camila Marroni Roncon e Dra. Miriam Mendonça Morato de Andrade pelos pertinentes apontamentos na qualificação e na defesa que contribuíram para o enriquecimento desta dissertação.

Ao meu pai, Wilson Baleotti “in memoriam” pelo exemplo de vida honesta e de bondade, voltado sempre para os livros e para conhecimento na intenção de aliviar o sofrimento dos seus semelhantes, plantou em mim a semente da busca através da ciência de soluções que aliviassem o sofrimento humano.

À minha mãe, Leda Polatti Baleotti que incentivou sempre em mim a busca pelo conhecimento através da filosofia, do raciocínio lógico para uma vida nos princípios da ética e coerência, me afastando das vaidades e futilidades humanas. A eles os quais dificilmente enxerguei sem uma leitura na mão o meu muito obrigado.

Ao meu filho Luca, pelo estímulo intenso e eterno de amor, para que eu me aprimore cada vez mais.

Ao meu marido Ednilson pelo companheirismo e apoio incessante, pelo carinho, pelo abraço e afeto.

Aos meus irmãos e esposas, exemplos de pessoas, dignas e trabalhadoras.

À Regina peça chave do meu desenvolvimento e sem a qual eu não teria alcançado meus objetivos.

À Silvia e Nádia com as quais eu pude sentir o lado doce da amizade sincera e carinhosa.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, fisioterapeutas José Otávio e Flávia pela paciência e incentivo de todo dia.

Aos meus colegas professores que dividiram seu apoio e conhecimento, o que foi fundamental para conclusão deste trabalho.

À bibliotecária Valéria pelo apoio técnico e pela amizade.

À farmacêutica Camila pelo apoio e atenção.

À fisioterapeuta e amiga Cássia pelo apoio.

Aos médicos Dra. Cacilda, Dra. Juliana, Dra. Conceição e Dr. José Roberto pelas colaborações e incentivo.

Existem pessoas que são anjos enviados por Deus nos momentos em que se pensa que algo não será possível, são anjos porque nos confortam com sorriso, carinho e que também nos carregam nos braços nas batalhas quando se está ferido, são anjos porque tem rosto de anjo e andam como anjo. Ariela, Paloma e Mariane vocês foram o melhor pelotão de anjos que Deus preparou e enviou para me aliviar, minha gratidão eterna por todo esforço que desempenharam nesse trabalho comigo. Sem o apoio de vocês na execução desse trabalho, ele não teria se realizado.

Ao meu companheiro de mestrado, Vinícius que me conduziu nos primeiros passos como um grande professor, seus ensinamentos e sua mão amiga foram fundamentais para o meu aprendizado.

À Josi e ao Matheus por dividirem comigo seu conhecimento e apoio.

Ao Rafael que tem contribuído no suporte técnico das pesquisas.

Muito obrigada!

BALEOTTI, Maria Eulália. **Efeito sistêmico da Buprenorfina na modulação de comportamentos defensivos relacionados com o transtorno da ansiedade generalizada e com o pânico.** 2017. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2017.

RESUMO

Fármacos antidepressivos como os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs; exemplos: fluoxetina e escitalopram) são drogas de primeira escolha no tratamento dos Transtornos de Ansiedade Generalizada (TAG) e do Transtorno do Pânico (TP). No entanto, apesar de eficazes na terapêutica, esses fármacos apresentam limitações no seu uso, tais como: os efeitos desejados ocorrem somente após administração crônica, em torno de 3 a 4 semanas após o início do tratamento; a proporção relativamente alta de pacientes que não respondem à medicação e o frequente aumento nos níveis de ansiedade desse pacientes no início do tratamento, levando à descontinuidade do uso destas drogas. Nesse sentido, há grande interesse na busca de novas estratégias de tratamento, identificando outros sistemas de neurotransmissão que possam estar relacionados à etiologia e, conseqüentemente, ao tratamento desses transtornos de ansiedade. Estudos prévios apontaram o envolvimento de opioides endógenos na modulação da ansiedade. Mais especificamente em relação ao TP, já se constatou que mecanismos opioides favorecem a atividade inibitória da serotonina em neurônios da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPD) que modulam a fuga/pânico, possivelmente por meio da formação de heterodímeros entre receptores 5-HT_{1A} e μ -opioide. Com base em tais aspectos, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito da Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide, sobre a manifestação de comportamentos defensivos relacionados com o TAG e com o TP. O uso de agonistas parciais justifica-se pela possibilidade de atenuar efeitos adversos sobrevividos do uso contínuo de agonistas plenos para os receptores μ -opioide, tais como a euforia, a tolerância e a dependência. Para isto, foram conduzidos dois experimentos utilizando ratos *Wistar*, seguindo-se em cada um deles dois tipos de avaliação: Teste de analgesia, como parâmetro da eficácia do fármaco e testes comportamentais Labirinto em T Elevado (LTE), Campo Aberto e Transição Claro-Escuro. No primeiro experimento foi implantado cirurgicamente um adesivo de Buprenorfina (5mg) entre a pele e o tecido subcutâneo, cujas avaliações foram conduzidas 27 horas após o implante. No segundo experimento utilizou-se um extrato liofilizado da Buprenorfina a partir dos adesivos, em 3 doses diferentes: 1,5 mg/kg; 3,0 mg/kg; 6,0 mg/kg. Todas as avaliações ocorreram 10 minutos após as injeções intraperitoneais. Os resultados mostraram que a Buprenorfina nas doses e vias estudadas desinibiu o comportamento de esquivas inibitórias no LTE e o comportamento motor dos ratos no Teste do Campo Aberto, mas não afetou as fugas no LTE e nem outras manifestações comportamentais no Teste de Transição Claro-Escuro, exceto no implante do adesivo, quando se observou ansiólise nesse teste. Na administração por via IP, esses resultados ocorreram em todos os testes, mas somente na reexposição, 24 horas após a primeira avaliação comportamental. Em conclusão, a Buprenorfina nas doses e vias estudadas apresentou efeito analgésico e desinibiu o comportamento de esquivas e o comportamento motor dos ratos, mas não afetou as fugas, o que indica seu envolvimento na modulação de comportamentos defensivos apenas relacionados com a manifestação da ansiedade generalizada. Nesta

dissertação, para maior aprofundamento do tema, foi inicialmente apresentada uma fundamentação teórica geral sobre as variáveis sob foco de investigação. Na sequência, foi exposto um artigo contendo uma fundamentação teórica mais específica, a descrição metodológica, bem como a análise e discussão dos resultados dos experimentos realizados.

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

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

ABSTRACT

Antidepressant drugs such as the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI; examples: fluoxetine and escitalopram) are first choice drugs for treating Generalized Anxiety Disorders (GAD) and Panic Disorder (PD). However, in spite of being therapeutically effective, such drugs present use limitations, such as: the desired effects occur only after chronic administration, within 3 to 4 weeks after the beginning of treatment; a relatively high proportion of patients who do not respond to the drug and the frequent increase of anxiety levels of such patients at the beginning of the treatment, leading to discontinuity in the use of such drugs. Along these lines, there is a great interest in the search of new treatment strategies, identifying other neurotransmission systems which may be related to the etiology and, consequently, to the treatment of such anxiety disorders. Previous studies pointed to the involvement of endogenous opioids in anxiety modulation. More specifically in relation to PD, one has found out that opioid mechanisms favor the inhibitory activity of serotonin in periaqueductal grey matter (dPAG) neurons which modulate escape/panic, probably by means of the formation of heterodimers between 5-HT_{1A} and μ -opioid receptors. Based on such features, this study was carried out aiming at investigating buprenorphine effects, a partial μ -opioid receptor agonist and κ -opioid receptor antagonist, on the manifestation of defensive behaviors related to GAD and PD. The use of partial agonists is justified by the possibility of attenuating adverse effects occurred after the continuous use of full agonists for μ -opioid receptors, such as euphoria, tolerance and dependence. Therefore, two experiments were carried out using Wistar rat, each one followed by two assessment types: analgesia test, as efficiency parameter of the drug and behavioral tests the elevated T-maze (ETM), Open Field and Light-Dark Transition. In the first experiment was surgically implanted a buprenorphine patch (5 mg) between the skin and the subcutaneous tissue, whose assessments were carried out 27 hours after the implantation. In the second experiment was used a buprenorphine extract based on the patches, with three different doses: 1.5 mg/kg; 3.0 mg/kg; 6.0 mg/kg. All the assessments were carried out 10 minutes after the intra-peritoneal injections. The results showed that buprenorphine administered in the studied doses and means uninhibited the inhibiting escape behavior in LTE and the motor behavior of rat in the Open Field Test, but did not affect escapes in LTE nor in other behavioral manifestations in the Light-Dark Transition Test, with the exception of the patch implant, when we were observed anxiolysis in this test. In the IP administration, such results occurred in all the tests, but only in the re-exposure, 24 hours after the first behavioral assessment. In conclusion, buprenorphine administered in doses and methods produced analgesic effect and impaired of the avoidance, but did not affected the escapes, which shows the involvement of this drug in the modulation of defensive behaviors only related with manifestation of generalized anxiety. In this dissertation, presented a general theoretical foundation on the variables focused on the investigation and afterwards, a paper with a more specific theoretical foundation, the methodological description, as well as the analysis and discussion of the results yielded in the conducted experiments.

Keywords: Buprenorphine. Elevated T-Maze. Generalized Anxiety Disorder. Opioids receptors. Panic Disorder.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Labirinto em T Elevado	23
Figura 2 - Teste de Transição Claro-Escuro	24
Figura 3 - Teste do Campo Aberto	25
Figura 4 - Vias serotoninérgicas prosencefálicas do Núcleo Dorsal da Rafe relacionadas com comportamentos de fuga e esquiva inibitória.....	29
Figura 5 - Envolvimento dos receptores opioides nos mecanismos de recompensa e nas manifestações de ansiedade e depressão.....	34
Figura 6 - Ação da Buprenorfina sobre receptores κ e μ	39

ARTIGO

Figura 1 - Número e duração dos comportamentos no teste de contorção.....	68
Figura 2 - Latência das esquivas 27 horas após implante do adesivo, 24 horas após o primeiro teste e 7 dias após implante	70
Figura 3 - Latência das fugas 27 horas após implante do adesivo, 24 horas após o primeiro teste e 7 dias após implante	72
Figura 4 - Número de quadrados percorridos no Campo aberto 27 horas após implante do adesivo, 24 horas após o primeiro teste e 7 dias após implante.....	73
Figura 5 - Latência de saída do lado claro e tempo de permanência no claro, número de espreitas, transições e quadrados percorridos 27 horas após implante.....	74
Figura 6 - Frequência e duração de contorções, levantamentos, autolimpeza e quadrados percorridos após Buprenorfina IP e seus controles.....	76
Figura 7 - Latências das esquivas após Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e seus controles e reexposição 24 horas após o teste.....	78
Figura 8 - Latência das fugas após Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e seus controles e reexposição 24 após o teste.....	79

Figura 9 - Número de quadrados percorridos no Campo Aberto após Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e seus controles e reexposição 24 horas após o teste.....	80
Figura 10 - Latência de saída do lado claro e tempo de permanência no lado claro após Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e seus controles e reexposição 24 horas após o teste.....	81
Figura 11 - Número de espreitas, transições e quadrados percorridos após Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e seus controles e reexposição 24 horas após o teste.....	82

LISTA DE SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptofano; Serotonina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina
ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APA	American Psychiatric Association
BZDs	Benzodiazepínicos
CEUA	Comitê de Ética para 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-enkefalina)
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	Food and Drug Administration
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
IMAO	Inibidores de monoaminoxidase
IP	Intraperitoneal
ISRSs	Inibidores da Recaptação de Serotonina
LB	Linha de Base
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTE	Labirinto em T Elevado
LTS	Lohmann Therapie Systeme
MPS	Ministério da Previdência Social
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe

NIMH	National Institute Mental of Health
NMR	Núcleo Mediano da Rafe
Nor-BNI	Nor-binaltorfimina
PCPA	Paraclorofenilalanina
POMC	Pré-proopiomelanocortina
PVPI	Polivinilpirrolidona-iodo
SCA	Sistema Comportamental de Aproximação
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPD	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
SCPV	Substância Cinzenta Periaquedutal Ventral
SDC	Sistema de Defesa Comportamental
SIC	Sistema de Inibição Comportamental
SLC18A2	Transportador de Solute Family 18 Member A2
SLC6A4	Transportador de Solute Family 6 Member 4
SNC	Sistema Nervoso Central
TAG	Transtorno da Ansiedade Generalizada
TH	Triptofanohidroxilase
TP	Transtorno do Pânico
VP	Vasopressina
WAY-100635	<i>N</i> -[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]- <i>N</i> -2-piridinil-ciclohexanecarboxamida
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis de ameaça, reação defensiva, emoção, transtorno associado e substrato neural.....	21
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	04
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO	15
Modelos para avaliação da ansiedade em animais	19
Neurobiologia da ansiedade	26
Sistema opioide e seus receptores	32
Tratamentos farmacológicos dos transtornos de ansiedade	35
Buprenorfina: possível alternativa no tratamento dos transtornos de ansiedade	38
REFERÊNCIAS	42
ARTIGO - Efeito sistêmico da Buprenorfina na modulação de comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico	49
Resumo	51
Introdução	53
Métodos	58
<i>Animais</i>	58
<i>Drogas</i>	59
<i>Teste de analgesia</i>	60
<i>Testes comportamentais</i>	60
<i>Teste do Labirinto em T Elevado (LTE)</i>	61
<i>Teste do Campo Aberto</i>	62
<i>Teste de Transição Claro-Escuro</i>	62
<i>Delineamento experimental</i>	63
<i>Experimento 1 - Avaliação da Buprenorfina após Implante dos adesivos</i>	63
<i>Cirurgia para implante dos adesivos</i>	63
<i>Teste de analgesia</i>	63
<i>Testes comportamentais</i>	63
<i>Experimento 2 - Efeito agudo da Buprenorfina sistêmica</i>	63
<i>Testes de analgesia</i>	64
<i>Testes comportamentais</i>	64

<i>Análise dos dados</i>	66
Resultados	67
<i>Experimento 1 - Avaliação da Buprenorfina após</i>	
<i>Implante dos adesivos</i>	67
<i>Teste de contorção</i>	67
<i>Labirinto em T Elevado</i>	68
<i>Campo Aberto</i>	73
<i>Teste de Transição Claro-Escuro</i>	73
<i>Experimento 2 - Efeito agudo da Buprenorfina sistêmica</i>	75
<i>Teste de contorção</i>	75
<i>Labirinto em T Elevado</i>	76
<i>Campo Aberto</i>	80
<i>Teste de Transição Claro-Escuro</i>	80
Discussão	83
Referências	90
ANEXO 1 - Normas da Revista <i>Journal of Psychopharmacology</i>	97
ANEXO 2 - Certificado de aprovação da CEUA	99

INTRODUÇÃO

Diante do marcado avanço tecnológico e das mudanças sócioeconômicas inerentes à sociedade moderna as pessoas passaram a sofrer com as pressões do cotidiano e em decorrência disso, os transtornos mentais se tornaram proeminentes na vida dos indivíduos. De acordo com dados da World Health Organization (WHO), 10% da população mundial é afetada por transtornos mentais e entre 1990 e 2013, o número de pessoas afetadas por um desses transtornos aumentou de 416 para 615 milhões. Levantamentos da mesma organização apontam que 30% das doenças não fatais da população são transtornos mentais e ainda estima-se que 1 em cada 5 casos atendidos nas salas de emergência hospitalar seja de depressão ou ansiedade, e que tais transtornos custam à economia mundial US\$1 trilhão por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Os transtornos mentais já são a terceira causa de afastamento no Brasil, dentre os quais a ansiedade e a depressão são os mais prevalentes (BRASIL, 2016). Andrade e colaboradores (2012) apontaram a concentração dos transtornos da ansiedade em grandes cidades, sugerindo a relação destes, e da depressão com a desigualdade social e com o estresse da urbanização. Em São Paulo, de acordo com a mesma pesquisa, a prevalência desses transtornos é alta em comparação com outras grandes cidades. Assim, vê-se que a ansiedade vem aumentando significativamente no Brasil. Diante de tal quadro, a ansiedade passou a ser estudada a partir de diferentes abordagens, visando a melhor compreensão desse transtorno, bem como buscando novas possibilidades terapêuticas. No entanto, essa busca não é recente, vem de longas datas. Estudiosos no passado já procuravam elucidar esse transtorno. Em 1869, Beard usou o termo “Neurastenia” para descrever situações de ansiedade e depressões leves, termo que incluía histeria, obsessões, hipocondria e ansiedade. A busca por um consenso quanto às definições de angústia, medo e ansiedade sempre estimulou pesquisadores, de modo que no princípio do século XX nasce a psicanálise e Freud cria uma nova expressão, a neurose da ansiedade, que diferenciava a neurastenia de Beard em duas formas de ansiedade: a crônica, que hoje é denominada Transtorno de Ansiedade Generalizada, caracterizada por preocupação excessiva e medo, com causas psicológicas possivelmente originadas em um pensamento ou desejo reprimido, e passível de cura pela intervenção psicoterapêutica; e a outra, a

ansiedade aguda, atualmente denominada Transtorno do Pânico, caracterizada por sensações catastróficas e sensações subjetivas de terror, que Freud considerava serem resultados de impulsos sexuais perturbados, resistentes à psicoterapia (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GABBARD, 2009).

Outra abordagem da ansiedade foi baseada nos ensaios e relatos de Darwin, por meio de uma visão fundamentada na ideia da seleção natural, em seu livro *A expressão das emoções no homem e nos animais* (1872), que culminou na perspectiva biológica para explicação do medo e da ansiedade.

Ainda no século XX, a Lei de Yerkes-Dodson (1908) apresentou uma distinção entre ansiedade normal e prejudicial, segundo a qual certos níveis de vigilância melhoravam a eficiência de tarefas: o prejuízo do desempenho seria proporcional ao aumento da ansiedade. Eles comprovaram e demonstraram, através de uma curva em forma de parábola, que o ápice da curva representa um estado de ansiedade saudável, culminando em uma eficiência cognitiva máxima. Porém à medida que o estímulo de ansiedade aumenta, a eficiência fica prejudicada (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GABBARD, 2009).

A partir do século XXI novas áreas da ciência, tais como, a psicobiologia, a psicofarmacologia, a biologia molecular e também a análise experimental do comportamento têm contribuído para o entendimento desses mecanismos de defesa e autopreservação propostos por Darwin em 1872. Os achados científicos apontam uma correspondência entre fatores biológicos e genéticos nas manifestações da ansiedade, que originam respostas neurofisiológicas específicas (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GABBARD, 2009; HARIRI et al., 2002).

Em 1952, a American Psychiatric Association (APA) publicou o primeiro *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*, DSM-I, com sucessivas edições ao longo de 60 anos (HETEM; GRAEFF, 2004). Segundo a 5ª e mais atual edição, o DSM-V (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), os transtornos de ansiedade são classificados em: Transtorno de Ansiedade de Separação, Mutismo Seletivo, Fobia Específica, Transtorno da Ansiedade Social, Transtorno de Pânico, Agorafobia, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno de Ansiedade induzido por substância ou medicamento, Transtorno de Ansiedade devido a outra condição médica e outro transtorno de ansiedade especificado.

Sabe-se que a ansiedade considerada como normal é inerente à sobrevivência. Segundo o National Institute of Mental Health - NIMH (2006a), a

ansiedade ocasional faz parte da vida em determinados períodos, como em situações de trabalho, antes de uma prova ou na tomada de uma decisão importante. No entanto, os transtornos de ansiedade vão além de preocupações temporárias. Nas pessoas acometidas por transtornos de ansiedade, esses sentimentos persistem e podem piorar com o tempo, interferindo em seu cotidiano, rendimento escolar e relacionamentos. Nesses casos, a ansiedade passa a ser compreendida como patológica caracterizando-se como persistente, excessiva, desproporcional ao evento que a desencadeou, causando sofrimento e prejudicando os relacionamentos interpessoais, causando prejuízo nas atividades sociais e funcionais do indivíduo. A ansiedade é gerada pela presença de uma ameaça, sendo o grau de percepção desta ameaça individual, resultante de fatores genéticos e de aprendizado, sobretudo experiências em fases críticas do desenvolvimento, as quais geram sinais e sintomas orgânicos que a potencializam ainda mais. Essa retroalimentação pode ser impedida por medicações que inibem as manifestações autonômicas simpáticas ou por diferentes alternativas de psicoterapia (BRANDÃO; GRAEFF, 2014). Torna-se importante frisar neste ponto de análise que medo e ansiedade são experiências emocionais distintas, evocados por situações distintas. Enquanto o medo se apresenta como uma resposta emocional a uma ameaça real e próxima, a ansiedade é resposta à antecipação de uma ameaça futura. Embora esses dois estados sejam parecidos, eles se diferenciam também nas consequências comportamentais advindas de tais estímulos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Dentre os vários transtornos de ansiedade, dois fazem parte do foco de interesse na presente abordagem: o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) e o Transtorno de Pânico (TP). O TAG é descrito como uma perturbação crônica, com preocupação excessiva (expectativa apreensiva), ocorrendo na maioria dos dias, por pelo menos 6 meses, sem que o indivíduo consiga controlar o quadro. O estado desse subtipo de ansiedade vem acompanhado de três ou mais dos seguintes sintomas: inquietação ou sensação de estar com os “nervos à flor da pele”, fadigabilidade, dificuldade de concentração ou sensação de “branco” na mente, irritabilidade, tensão muscular, distúrbios do sono. É incapacitante, levando a dificuldades sociais e laborativas, interferindo no funcionamento psicossocial. A preocupação excessiva acerca de eventos e atividades que são circunstâncias

diárias da rotina de vida, tornam-se desproporcionais em relação à probabilidade real de impacto do evento antecipado (DSM-V).

Este transtorno é mais prevalente em mulheres na proporção de dois para um e os descendentes de europeus têm maior probabilidade de apresentar o transtorno, assim como os indivíduos dos países desenvolvidos em comparação com os de países subdesenvolvidos. A prevalência é maior na meia-idade e apresenta declínio na idade avançada. Nos adultos mais jovens a gravidade dos sintomas é maior do que nos adultos mais velhos. Quanto mais cedo os indivíduos apresentarem sintomas de TAG, mais tendem a ter comorbidades. Embora adversidades na infância e superproteção parental tenham sido relacionadas ao TAG, não há fatores ambientais específicos suficientes para fazer o diagnóstico. Já o fator genético se apresenta como risco para o transtorno (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BRANDÃO, 2012).

O TAG está associado à incapacidade, o que na população norte-americana gerou por ano 110 milhões de dias de afastamento por incapacidade. No Brasil, segundo dados da Previdência Social, foram pagos 1.283 benefícios por afastamento do trabalho nos meses de janeiro a junho de 2016, sendo que o TAG foi responsável por 230.940 dias destes afastamentos. Isto reflete apenas o que foi contabilizado pela Previdência Social, sem registrar outros afastamentos da previdência privada ou os que não contaram com auxílio previdenciário. A comorbidade desses transtornos com depressão é bastante comum (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BRANDÃO, 2012; BRASIL, 2016).

O TP caracteriza-se por ataques intensos e recorrentes. É um surto abrupto de sensação de medo, inesperado, com grande desconforto que alcança o pico em minutos, a partir de um estado calmo ou ansioso, com pelo menos 4 dos 13 sintomas descritos a seguir pelo DSM-V: palpitação, taquicardia, sudorese, tremores ou abalos, sensação de falta de ar ou sufocamento, dor ou desconforto torácico, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio, calafrios ou ondas de calor, parestesias, sensação de perda do controle, e sentimento de morte iminente. Estes ataques são seguidos de uma ou mais das características a seguir: apreensão e preocupação de um novo ataque, alterações no comportamento (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

De acordo com o DSM-V, enquanto a prevalência em crianças abaixo de 14 anos é baixa, em adultos e adolescentes é de 2 a 3%, sendo maior nas mulheres

que nos homens na proporção de dois para um. Há um declínio da prevalência em idosos acima de 64 anos. O transtorno se não tratado torna-se crônico, e a remissão completa acontece em uma minoria dos casos. O curso da doença pode ser complicado por outros transtornos de ansiedade, depressão e uso de substâncias. No entanto não se constitui como consequência ao abuso de drogas e ou de outras condições clínicas. Fatores temperamentais como afetividade negativa, fatores ambientais como abusos e tabagismo e fatores genéticos parecem se constituir fatores de risco para o desenvolvimento do TP (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BRANDÃO, 2012). No Brasil a prevalência de TP numa população de 5037 indivíduos de São Paulo foi de 1% (ANDRADE et al., 2012).

Assim como no TAG, os ataques de TP estão associados à incapacidade das atividades funcionais e sociais, levando ao afastamento do trabalho, evasão escolar e maior frequência em serviços médicos, provocando prejuízos econômicos. É um transtorno que pode apresentar comorbidade com outros transtornos de ansiedade e também com a depressão maior, transtorno bipolar e alcoolismo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BRANDÃO, 2012).

Modelos para avaliação da ansiedade em animais

Na tentativa de se compreender os transtornos supracitados, modelos animais de comportamento para o estudo experimental têm sido usados, tanto para avaliação pré-clínica de novas drogas e seus mecanismos de ação, como também visando elucidar a neurobiologia e fisiopatologia desses transtornos (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Para ser considerado adequado, é preciso que um modelo animal de comportamento humano atenda a três critérios: 1. Validade de face, que diz o quanto um modelo animal pode reproduzir um comportamento ou condição clínica, ou seja, refere-se à semelhança entre o modelo animal e a condição humana de interesse; 2. Validade preditiva, que diz respeito à resposta do modelo animal a agentes medicamentosos terapêuticos (por exemplo, sob este critério, a ansiedade é demonstrada como o contrário do que o animal apresenta ao ser tratado com o ansiolítico); 3. Validade de construto, que envolve todos e quaisquer elementos que definem ou caracterizam o transtorno estudado levando em consideração os pressupostos teóricos e a relação de semelhança entre o modelo e o

comportamento humano. Os modelos animais, mesmo com as limitações que possam apresentar, têm sido valiosos na compreensão dos mecanismos subjacentes à manifestação da ansiedade, visando à intervenção e a prevenção da manifestação deste transtorno no homem (BLANCHARD; SUMMERS; BLANCHARD, 2013; NUNES; HALLAK, 2014; OLIVEIRA, 2007).

Os primeiros modelos experimentais desenvolvidos se fundamentaram no behaviorismo: no condicionamento Pavloviano e no modelo instrumental ou operante proposto por Skinner, que envolve conflito de aproximação ou esquiva dependendo do estímulo. No entanto, os testes de conflito mostraram-se pouco eficazes para avaliar drogas que atuam no sistema serotoninérgico. Ainda mais, de acordo com a etologia, o animal só reproduz seu comportamento no ambiente natural, e os testes de conflitos são carregados de artificialidades por criarem estados motivacionais como dor, fome, sede e treinamento que podem interferir no comportamento animal e confundir as análises de ansiedade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1987; HETEM; GRAEFF, 2004).

A partir destas constatações pesquisadores passaram a buscar modelos de ansiedade com fundamentos etológicos. A averiguação, que vem ocorrendo diante de diversas pesquisas, que cada transtorno de ansiedade é mediado por sistemas neurobiológicos distintos, tem fundamentado a separação dos transtornos em categorias diagnósticas também distintas pelo DSM. Desse modo, os modelos experimentais, envolvendo animais de laboratório foram sendo elaborados na tentativa de replicar características e sintomas de ansiedade experimentados pela espécie humana.

Nessa direção, com base nas proposições de Darwin já mencionadas anteriormente nesse texto, as raízes da ansiedade e do medo estão nas reações de defesa dos animais diante de estímulos de perigo e ameaça tais como, a presença ou odor do predador, estímulos ambientais, como altura, iluminação, exposição a lugares novos, estímulos nociceptivos como choque, calor ou injeção de substâncias, dentre outros. Diante de tais estímulos os animais apresentam comportamentos de defesa que são basicamente fuga, esquivas, avaliação de risco, imobilização, ataque defensivo e submissão (HETEM; GRAEFF, 2004; PINHEIRO et al., 2007).

Blanchard, Griebeli e Blanchard (2001) classificaram o tipo de defesa utilizada de acordo com o nível de ameaça: para ameaças potenciais os animais apresentam

exploração cautelosa em direção à fonte de perigo, avaliando o risco, com várias tentativas de exploração e esquiva. Na ameaça distal, apresentam fuga ou imobilidade. Os animais tentam se safar escapando da situação de perigo caso haja uma rota de saída, porém se não houver como escapar, ficarão imóveis, comportamento denominado congelamento. Na ameaça proximal, o animal apresenta tentativas descontroladas de fuga e agressão defensiva que se expressa por posturas de ameaça ou mordidas ao predador. As respostas de defesa têm sido associadas aos transtornos de ansiedade da seguinte maneira: a avaliação de risco e inibição comportamental, como resposta ao perigo potencial são associadas ao TAG, e a fuga resposta a um estímulo proximal tem sido associada ao TP, como mostra a Tabela 1 (HETEM; GRAEFF, 2004; PINHEIRO et al., 2007).

Tabela 1 - Níveis de ameaça, reação defensiva, emoção, transtorno associado e substrato neural.

Nível de ameaça	Padrão de reação defensiva	Emoção	Transtorno	Substrato Neural
Potencial	Avaliação de risco Esquiva	Ansiedade	Transtorno de Ansiedade Generalizada	Amígdala, Septo-Hipocampo
Distal	Fuga Imobilidade	Medo	Fobia específica	Amígdala, SCPV
Proximal	Fuga Ataques defensivos	Pânico	Transtorno do Pânico	Amígdala, Hipotálamo Medial, SCPD

Fonte: Adaptado de Hetem e Graeff (2004).

Os transtornos de ansiedade como TAG e TP desencadeiam reações diferentes e, portanto, os modelos animais para avaliação dos mesmos devem avaliar esses transtornos diferencialmente (HETEM; GRAEFF, 2004).

Nesta direção o modelo animal mais utilizado nas últimas décadas para avaliação da manifestação da ansiedade tem sido o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), proposto por Pelow, Chopin e Briley (1985), com avaliação de diferentes comportamentos exploratórios e inibitórios, baseado em pressupostos etológicos (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; GRAEFF, 2007; SILVA et al., 2012). Porém este teste mostrou inconsistências em relação ao efeito de drogas que interferem na neurotransmissão serotoninérgica (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

Considerando esses vários aspectos Graeff, Viana e Tomaz (1993) propuseram um teste derivado do LCE, o Labirinto em T elevado (LTE) que visa avaliar separadamente dois tipos de comportamento no mesmo animal e no mesmo teste: o comportamento de esquiva inibitória e o de fuga. Esses comportamentos têm sido associados, respectivamente, à Ansiedade Generalizada que ocorre no contexto de ameaça potencial e ao Pânico, que por sua vez ocorre na ameaça proximal (ANDRADE; ZANGROSSI; GRAEFF, 2013; BLANCHARD et al., 1993; CAMPOS et al., 2013; PINHEIRO et al., 2007; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

O LTE é constituído por três braços com a mesma dimensão (50 x 70 cm), todos elevados a 50 cm do chão, um braço fechado com paredes altas de 40 cm, perpendicular a dois braços abertos (Figura 1). Para medir a esquiva inibitória, o animal é colocado na parte posterior do braço fechado por três vezes, medindo-se a latência para retirar-se com as quatro patas desse local, com intervalos de 30 segundos entre cada uma das exposições. Se o animal não sair do braço fechado em 300 segundos, ele é retirado pelo experimentador e 30 segundos após retornado ao aparato. A aprendizagem é percebida pelo aumento da latência ao longo das 3 esquivas. Para a medida das fugas, após 30 segundos da avaliação da última esquiva, o animal é colocado na extremidade do braço aberto no qual ele foi confinado por 30 minutos, 24 h antes do teste. O tempo de latência até alcançar com as quatro patas a área central do aparelho é tomado por 3 vezes com intervalos de 30 segundos entre cada fuga. Caso ocorra uma latência de 300 segundos, o animal é retirado do braço aberto, aguardando-se 30 segundos para a nova exposição a esse mesmo local, até completarem as três medidas (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000). Assim como no LCE, esse modelo baseia-se na aversão que ratos e camundongos criados em laboratório apresentam a lugares abertos, elevados e iluminados. Assim, a preferência dos animais será manter-se no ambiente fechado, após o primeiro contato com o aparelho, que ocorre na primeira exposição ao braço fechado, denominada Linha de Base (LB). Nas duas próximas exposições, a tendência dos animais é demorar mais para sair desse local, ou seja, após o reconhecimento inicial há uma clara definição de sua preferência em permanecer no local fechado e pouco iluminado, comportamento este denominado como esquiva inibitória. Por outro lado, quando os animais são colocados na extremidade de um dos braços abertos, num local já reconhecido na véspera como aversivo, os mesmos saem rapidamente em direção ao local fechado do aparelho, comportamento este

denominado de fuga (GRAEFF, 2007; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000). Foi demonstrado que drogas reconhecidamente ansiolíticas na clínica diminuem a preferência dos animais pelo braço fechado, sem alterar a fuga. O uso crônico de antidepressivos inibe a fuga nos braços abertos, correspondendo ao que tem sido identificado na clínica no tratamento do TP com esses fármacos (GRAEFF, 2003; PINHEIRO et al., 2007; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003). Em decorrência disto, esses pesquisadores associaram as esquivas inibitórias ao TAG e as fugas ao TP (HETEM; GRAEFF, 2004).

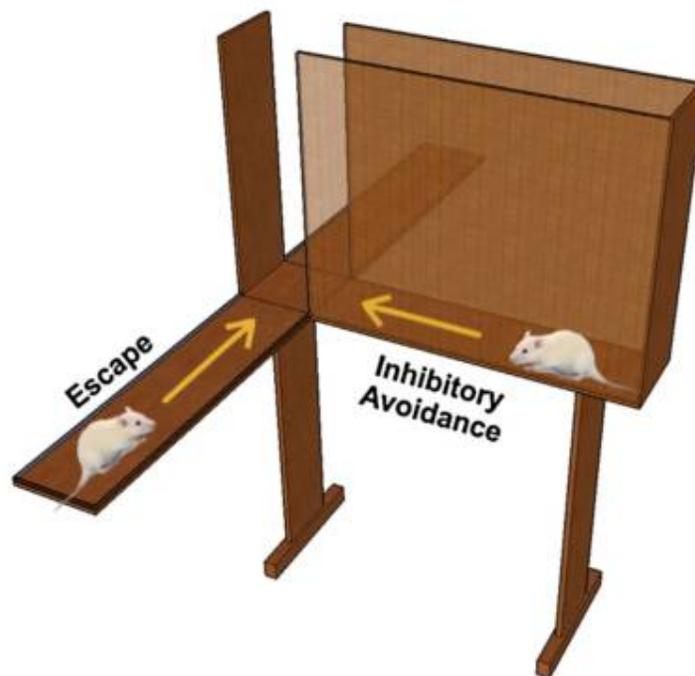


Figura 1 - Labirinto em T elevado. Fonte: Zangrossi e Graeff (2014).

Outro modelo animal de ansiedade que tem sido amplamente utilizado, o Teste de Transição Claro-Escuro, foi proposto por Crawley e Goodwin (1980). Nesse modelo, os animais são colocados em uma caixa fechada com dois compartimentos, um claro, fechado com vidro transparente permitindo a entrada de luz, e outro escuro, totalmente fechado com madeira (Figura 2). Supõe-se que a ansiedade seja gerada pelo conflito entre comportamento exploratório espontâneo e a aversão inata a lugares novos e iluminados, já que o aparato todo é totalmente fechado. Nesse teste, as transições são tomadas como índice da atividade de exploração e o tempo

em cada compartimento reflete o comportamento de aversão ou não ao local. Tal paradigma tem sido utilizado para avaliar os efeitos de ansiolíticos clássicos, como dos benzodiazepínicos, e também dos mais recentes, com vantagens de ser rápido e fácil sem necessitar de treino prévio dos animais. O índice de atividade ansiolítica então é indicado pelo aumento no número de transições do claro para o escuro, assim como no tempo de permanência no claro, na latência de saída do lado claro para o escuro e diminuição nas tentativas de saída do lado escuro, comportamento em que o animal fica com o corpo no lado escuro e a cabeça espreita o lado claro, avaliando o risco (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; HASCOËT; BOURIN; DHONNCHADHA, 2001; HETEM; GRAEFF, 2004; SILVA et al., 2012).



Figura 2 - Teste de Transição Claro-Escuro. Fonte: O autor.

Também considerado modelo animal de ansiedade, proposto por Carl Hall na década de 1930 (PRUT; BELZUNG, 2003), o Teste do Campo Aberto foi um dos primeiros testes utilizados para avaliar a atividade locomotora e comportamento de ansiedade em ratos. O teste é realizado em uma arena circular ou quadrada iluminada, com paredes que não permitem a fuga do animal, e tem o assoalho demarcado (Figura 3). Hall percebeu que quando os ratos passavam por privação de comida, se deslocavam mais na arena, apresentavam um aumento na defecação, e, nesse caso, passavam a se deslocar rente as paredes por apresentarem tigmotaxia¹. Hall considerou que a quantidade de quadrados percorridos, locomoção central ou periférica, e a quantidade de bolos fecais presentes na arena indicavam o

¹ Tigmotaxia - uma especialização do sistema nervoso somatossensorial que permite experimentar a sensação da posição das partes do corpo, induzindo nos roedores a tendência de permanecer perto de superfícies verticais, para que haja contato das vibrissas com a superfície, configurando direção e segurança (PRUT; BELZUNG, 2003).

estado emocional do animal. As avaliações podem ser realizadas colocando os animais no centro da arena e fazendo observação desses comportamentos por períodos de 2 a 20 minutos. Usualmente se faz a observação por 5 minutos. Esse teste tornou-se conveniente não apenas para medir ansiedade, mas especialmente para avaliar a atividade locomotora e a sedação. Um número maior de deslocamentos centrais e de tempo de permanência no centro, sem modificações de locomoção total e da exploração vertical, assim como diminuição de comportamentos de avaliação de risco dirigida para o centro da arena, pode ser associado à ansiólise, enquanto uma inversão dessas variáveis pode ser associada à ansiogênese. Um aumento de locomoção pode ser associado a um efeito estimulante enquanto diminuição de deslocamentos e exploração vertical é associada à sedação ou prostração pós-ictal. Trabalhos mostram que o Teste do Campo Aberto é um modelo animal viável para avaliar a ação de benzodiazepínicos clássicos e de outros ansiolíticos (BRANDÃO, 2012; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; OLIVEIRA et al., 2007; PRUT; BELZUNG, 2003; SILVA et al., 2012).



Figura 3 - O Teste do Campo Aberto à esquerda arena quadrada e à direita arena circular. Fonte: O autor.

Assim, através desses testes mencionados, em conjunto com testes diagnósticos clínicos, têm sido demonstrado que a ansiedade e o pânico apresentam mecanismos neurobiológicos distintos. Nessa direção cada subtipo de ansiedade tem uma base neural própria e responde distintamente às diferentes alternativas terapêuticas (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GRAEFF, 2007; HETEM; GRAEFF, 2004).

Neurobiologia da ansiedade

De maneira mais abrangente as bases neuroanatômicas para o medo e ansiedade, com base em resultados científicos, foram descritas como sendo dois sistemas de comando sobre os comportamentos defensivos, a saber, o Sistema de Inibição Comportamental e o Sistema Cerebral de Defesa.

O Sistema de Inibição Comportamental (SIC), proposto por Gray (MCNAUGHTON; GRAY, 2000), associa a ansiedade à ativação deste sistema de comportamento, disparado por estímulos como punição ou frustração, estímulos ameaçadores inatos e de novidade, sendo que todos eles provocam a inibição de qualquer comportamento em curso e aumentam o nível de vigilância e atenção. Gray propõe o sistema Septo-Hipocampal como o substrato neural do SIC. Seus experimentos evidenciaram que as lesões provocadas no Septo e Hipocampo ocasionavam comportamentos similares aos que as drogas ansiolíticas produziam nos animais quando avaliados nos testes. Tanto as drogas ansiolíticas como as lesões estariam prejudicando o sistema de inibição por atuarem provavelmente sobre as vias serotoninérgicas e noradrenérgicas. Levita e colaboradores (2014), ainda sobre as proposições de Gray, desenvolveram um trabalho associando morfologia do Hipocampo e Amígdala com ansiedade. Exames de ressonância magnética e questionários foram aplicados em indivíduos saudáveis e relacionados depois. Os achados indicaram que indivíduos com escalas de ansiedade aumentada apresentavam um aumento de volume hipocampal sugerindo que a alteração morfológica do Hipocampo pode ser fator de risco para desenvolvimento de ansiedade relacionada ao SIC. Gray propôs que uma estrutura do Hipocampo denominada Subículo exerceria um papel de comparador ou conferidor das informações do mundo exterior e os dados já armazenados por experiências anteriores, pela sua ligação com o Córtex Entorrinal e Circuito de Papez, e que após conferir as informações permitiria a inibição comportamental resultando em ansiedade (BRANDÃO et al., 2003; CARVALHO-NETTO, 2009; HETEM; GRAEFF, 2004; RIBAS, 2007).

Por outro lado, o Sistema Cerebral de Defesa (SCD) foi fundamentado nos relatos das observações Darwinianas, como também nas constatações de Walter R. Hess (HETEM; GRAEFF, 2004). Após aplicar estímulos elétricos no Hipotálamo Medial de gatos por meio de eletrodos implantados por cirurgia extereotóxica, Hess

percebeu reações de defesa bem evidentes de fuga ou luta como as evocadas por estímulos de ameaça. As reações comportamentais vinham acompanhadas de manifestações neurovegetativas, como piloereção, midríase, hiperventilação, aumento de pressão e frequência cardíaca, o que denominou como reação de defesa afetiva. Evidenciou-se que as reações eram dirigidas ao experimentador, com manifestações diferentes das de um ataque ofensivo. Foi notado ainda que de acordo com o aumento da intensidade da corrente, as respostas se tornavam mais contundentes. Esses resultados indicaram que há um circuito cerebral envolvido com as reações de defesa adaptativas relacionadas ao medo, o que corroborou com as observações de Darwin. Em seguida, o grupo de Hess explorou sítios subcorticais onde a estimulação elétrica era capaz de eliciar reações de defesa, e delimitou essas regiões, que compreendem um contínuo formado pela Substância Cinzenta que margeia o Terceiro Ventrículo no Diencefalo (Substância Cinzenta Periventricular no Hipotálamo Medial), prosseguindo em sentido caudal à área que circunda o Aqueduto do Mesencefalo, a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP). Estimulou ainda a Amígdala, e suas vias de ligação com o Hipotálamo, obtendo, do mesmo modo, respostas de defesa, porém de uma maneira retardada, sendo que mesmo depois de desligada a eletroestimulação, as reações ainda se mantinham presentes, sugerindo então uma influência moduladora da Amígdala sobre o Hipotálamo e a SCP. Assim o SCD é constituído pela Amígdala, Hipotálamo e SCP, que são interconectados por vias nervosas, onde a Amígdala faz um papel de avaliadora dos estímulos recebidos do meio externo, e transfere o resultado ao Hipotálamo e SCP que, por sua vez, selecionam e organizam então as respostas comportamentais e fisiológicas mais adequadas ao grau de ameaça (BRANDÃO et al., 2003; BRANDÃO; GRAEFF, 2014; HETEM; GRAEFF, 2004).

Gray e McNaughton, em 2000, fizeram uma proposta teórica com a integração do SIC e SCD e um terceiro Sistema Comportamental de Aproximação (SCA), este responsável pela orientação do animal a demandas biológicas de alimento e sexo, cuja obtenção gera prazer, o que é representado anatomicamente pelo *Núcleo Accumbens* innervado pelo sistema dopaminérgico ascendente. Para esses autores, quando um mesmo objeto evoca duas tendências, a de aproximação do SCA e a esquivada do SCD, está criado o conflito e configurada a ansiedade. Na proposição dos autores o detector do conflito é a região Septo-Hipocampal, que desencadearia as manifestações próprias do SIC, como aumento de vigilância e

atenção dirigida para fontes de perigo. A contribuição deste construto foi a distinção entre a ansiedade, gerada pelo conflito, e o medo, configurado pela aproximação do perigo, elucidando ainda mais a distinção qualitativa das emoções de medo e ansiedade. Também contribuiu para determinação da Amígdala na participação da ansiedade, além do Septo e Hipocampo (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; HETEM; GRAEFF, 2004; RIBAS, 2007).

As evidências científicas até então têm mostrado que quando a ameaça é potencial, os comportamentos de esquiva ou de avaliação de risco estão presentes, e os substratos neurais são a Amígdala e o Septo-Hipocampo, e teriam uma manifestação comportamental compatível com o TAG. No caso da ameaça distal, quando o comportamento é o congelamento, os substratos neurais são a Amígdala e a Substância Cinzenta Periaquedutal Ventral (SCPV) e a emoção associada é o medo. Quando, enfim, a ameaça é proximal com risco iminente, os comportamentos de fuga e ataque defensivo estão presentes, há ativação da Amígdala, Hipotálamo Dorso Medial e SCPD, e a emoção associada é o pânico correspondente ao TP (Tabela1). No entanto, Carvalho-Netto (2009), sustentado por Canteras (2008), sugeriu que há uma integração das vias neurais presentes em todos os comportamentos de defesa, seja a ameaça potencial ou proximal. Brandão e colaboradores (2003) afirmam que tanto o medo, como pânico e a ansiedade estão representados em todos os níveis cerebrais, embora que no medo, e no pânico pareça ser mais presente a participação de estruturas caudais, enquanto na ansiedade estruturas rostrais (ANDRADE; ZANGROSSI; GRAEFF, 2013; BRANDÃO et al., 2003; BRANDÃO; GRAEFF, 2014; CARVALHO-NETTO, 2009; HETEM; GRAEFF, 2004).

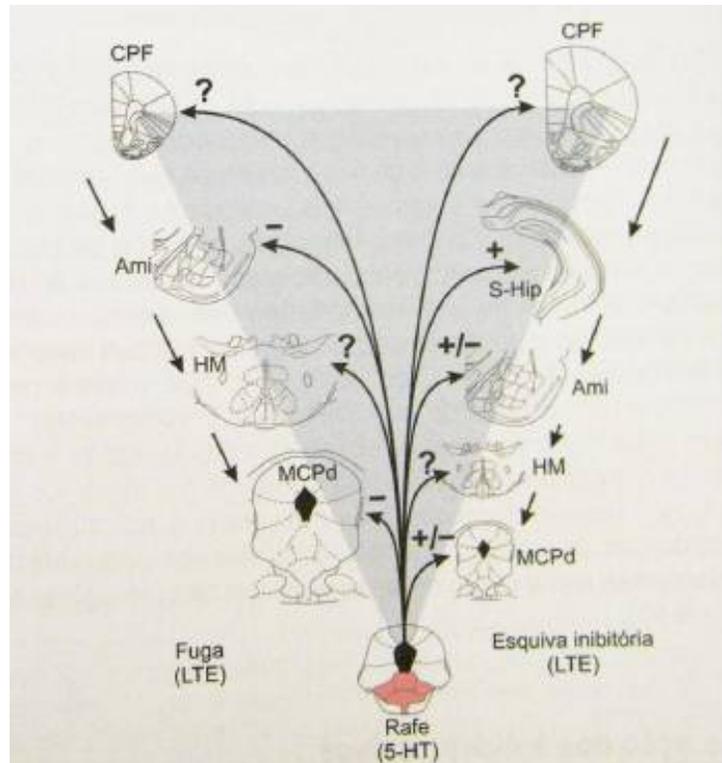


Figura 4 - Vias serotoninérgicas prosencefálicas do Núcleo Dorsal da Rafe relacionadas com comportamentos de fuga e esquiva inibitória. CPF: Córtex Pré-Frontal; Ami: Amígdala; S-Hip: Sistema Septo-Hipocampal; HM: Hipotálamo Medial; MCPd: Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal; LTE: Labirinto em T Elevado; 5-HT: Serotonina. Fonte: adaptado de Brandão e Graeff, 2014.

Integrando todas essas informações, Deakin e Graeff (1991) propuseram que os transtornos de ansiedade são regulados pela serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT)² e têm mais de um mecanismo de controle. Um dos apontados foi a via serotoninérgica prosencefálica do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR)³ que se projeta para o

² A serotonina (5-HT), uma indolamina biossintetizada a partir do triptofano da dieta pela ação da enzima triptofano-hidroxilase, está presente nas células enterocromafins, onde se encontra 90% da quantidade total de 5-HT do corpo, e nos neurônios. A 5-HT também tem sido identificada nas plaquetas, porém nesse local não ocorre biossíntese. A 5-HT é degradada pela monoamina oxidase (MAO), formando um aldeído 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) que é excretado pela urina. Nas células enterocromafins, a 5-HT provoca aumento de motilidade do trato gastrointestinal. Nas plaquetas atua na agregação plaquetária e estimula terminações nervosas nociceptivas periféricas. No sistema nervoso, é um importante neurotransmissor capaz de modular o humor e as reações de fuga ou luta, sendo inibitória para impulsos de dor, e exercendo papéis distintos em determinadas situações em áreas específicas, quando há o envolvimento de emoções como o medo e a ansiedade. Foram identificados 7 receptores de serotonina, com seus subtipos totalizando 14 receptores reconhecidos ligados à proteína G, com exceção do 5-HT₃, ligado diretamente a canais de íons, distribuídos por todo o SNC, exceto o 5-HT_{2B} que é encontrado apenas no fundo gástrico (GRAEFF, 2003; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; RANG; DALE, 2004; SADOCK; SADOCK, 2016).

Córtex Pré-Frontal, Hipocampo, e Amígdala. Esta facilitaria a resposta, a um perigo potencial, provocando comportamentos como a esquiva inibitória. O outro mecanismo indicou que a via periventricular do NDR³, 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 (Figura 4). O mau funcionamento dessas duas vias serotoninérgicas 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 causariam o Transtorno de Pânico. Além disso, a teoria propõe que projeções do Núcleo Mediano da Rafe (NMR) a receptores 5-HT_{1A} localizados no Hipocampo estariam relacionadas com a manifestação de respostas comportamentais ao estresse. Esse mecanismo seria o responsável pela resiliência aos mais variados estímulos. O mau funcionamento dessa via poderia levar ao surgimento de sintomas depressivos. Em revisão recente Andrade, Zangrossi e Graeff (2013) apresentaram que esta mesma via, apontada por McNaughton e Gray (2000) como fundamental na compreensão dos processos de inibição comportamental, está relacionada com a manifestação da Ansiedade Generalizada, especialmente pela ativação de receptores 5-HT_{1A}. Já se conhece que quando esses receptores estão distribuídos nos corpos celulares e dendritos neuronais são denominados receptores somatodendríticos ou autossômicos e exercem um papel de retroalimentação negativa sobre a atividade neuronal.

Em síntese, a teoria de Deakin e Graeff (1991), permite pressupor que a 5-HT inibiria o pânico, embora facilitaria a ansiedade. Pesquisas foram conduzidas, utilizando o modelo animal LTE e drogas que acentuavam ou diminuíam as concentrações de serotonina na Amígdala e SCPD. Os estudos indicaram que as drogas agonistas da 5-HT na Amígdala aumentavam a esquiva, enquanto que drogas que diminuíam a 5-HT na Amígdala diminuíam a esquiva (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Em contrapartida, o aumento da 5-HT na SCPD inibia a fuga, e a diminuição

³ No SNC, vias serotoninérgicas se projetam através de feixe de fibras com direções ascendentes para o córtex, tronco encefálico e cerebelo, e com projeções descendentes para medula espinhal. Essas vias têm origem nos Núcleos Dorsal e Mediano da Rafe, ambos situados no mesencéfalo. O Núcleo Dorsal da Rafe (NDR), através de fibras finas, emite projeções para Amígdala, Hipocampo Ventral, SCP, Corpo Estriado e Córtex pré-frontal. O Núcleo Mediano da Rafe (NMR), através de um denso conjunto de neurônios e, portanto, fibras grossas, se projetam para várias estruturas do prosencéfalo, especialmente para o hipocampo dorsal (ANDRADE; ZANGROSSI; GRAEFF, 2013; GRAEFF, 2003; HETEM; GRAEFF, 2004).

da 5-HT aumentava esse comportamento (GRAEFF, 2003), indicando um papel distinto da 5-HT nas regiões que modulam ansiedade, confirmando os pressupostos do papel ansiolítico da 5-HT na SCPD e ansiogênico na Amígdala.

Estudos recentes têm mostrado uma interação entre sistema serotoninérgico e sistema opioidérgico na modulação dos Transtornos da Ansiedade, TAG e TP. Roncon e colaboradores (2013) testaram a ação da morfina, agonista pleno de receptor opioide, e 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) agonista de receptor 5-HT_{1A}, no LTE e constataram aumento da latência nas fugas, o que está relacionado, com efeito panicolítico destas drogas. Os antagonistas da morfina, naloxona e de 5-HT_{1A}, N- [2- [4- (2-metoxifenil) -1-piperazinil] etil] -N- 2-piridinil-ciclohexanocarboxamida Maleato (WAY-100635) foram capazes de suprimir esses efeitos panicolíticos. Neste mesmo estudo, a naloxona antagonizou o efeito panicolítico do agonista serotoninérgico. Diante disto os autores sugerem uma interação do sistema serotoninérgico e opioidérgico, e que pesquisas do sinergismo destes sistemas ajudariam a esclarecer a interação dos mesmos como possíveis moduladores das emoções.

De fato, Tao e Auerbach (2002), buscando evidências de interações entre essas vias, administraram agonistas opioides μ , κ e δ nos NMR, NDR e *Núcleo accumbens*, e viram que a ativação de receptores μ e δ por agonistas aumenta a concentração de serotonina extracelular no NDR, mas não no NMR, e que, ao contrário, receptores κ , quando ativados por agonista, diminuem essas concentrações tanto no NMR quanto no NDR e *Núcleo accumbens*, o que levou a concluírem que há uma interação entre essas vias e que essa interação pode causar interferências diferentes dos distintos receptores opioides sobre os mecanismos de ansiedade regulados por vias serotoninérgicas. Numa outra abordagem, mas na mesma direção, lesões provocadas nos Núcleos da Rafe por paraclorofenilalanina (PCPA) eliciaram respostas exageradas de sistemas sensoriais, demonstrando que a integridade das vias serotoninérgicas está relacionada com a normalidade desses impulsos, inclusive na transmissão das vias da dor na medula e no cérebro, pois essas lesões mostraram um efeito antagônico aos efeitos analgésicos da morfina, enquanto os inibidores da recaptação de serotonina causaram um efeito contrário, sugerindo um sinergismo entre 5-HT e opioides (RANG; DALE, 2004).

Sistema opioidérgico e seus receptores

Os opioides, uma classe de neurotransmissores peptídicos denominados opioides endógenos, são as encefalinas, β -endorfina e dinorfina. Possuem precursores distintos que são codificados por 3 genes diferentes, embora todos tenham uma sequência amino terminal comum, chamada de unidade opioides, que os caracteriza. Assim os peptídeos, pré-proopiomelanocortina (POMC) é precursor da β -endorfina; pré-proencefalina é precursor da encefalina; e o pré-prodinorfina dá origem às dinorfinas (COLASANTI et al., 2011).

Esses neuropeptídeos atuam no SNC e em tecidos periféricos através de seus receptores, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G. Os receptores foram nomeados com letras gregas que faziam referência à letra inicial da substância que seria capaz de estimulá-los: os receptores μ (mu), ativados pela morfina, se ligam à endorfina e têm atuação relacionada com analgesia, respiração e trânsito gastrointestinal, sendo encontrados nas lamínas III e V do Córtex Cerebral, no Tálamo, SCP, Substância Gelatinosa e Trato Gastrointestinal; os receptores κ (kappa), responsivos à cetociclazocina, se ligam à dinorfina e estão envolvidos na analgesia, controle da diurese, e secreção neuroendócrina. São encontrados no Hipotálamo, SCP, Substância Gelatinosa, Medula Espinhal e em Neurônios Sensitivos Periféricos; e os receptores δ (delta), que se ligam às encefalinas. A ativação dos mesmos está relacionada ao acionamento de mecanismos de analgesia, cognição e dependência física. Estão distribuídos no Núcleo Pontino, Amígdala, Bulbo Olfatório, Córtex Cerebral Profundo e Neurônios Sensitivos Periféricos (HÖKFELT; BARTFAI; BLOOM, 2003; LUTZ; KIEFFER, 2013; MARTINS et al., 2012).

Esses opioides e seus receptores desempenham um papel bem definido e importante no controle e modulação da dor. Entretanto as suas atuações em outros sistemas fisiológicos, como nas respostas ao estresse, respiração e trânsito gastrointestinal, bem como em funções imunológicas e humorais, vêm sendo investigadas. Em 1970, Pert e Yaksh (apud FENG et al., 2012) relataram que a morfina injetada em várias regiões do cérebro foi capaz de diminuir o limiar da dor principalmente quando injetada na SCPD. Em 1973, Pert e Snyder demonstraram que havia receptores opioides em locais como Amígdala, Hipotálamo, Núcleo Caudado, Tálamo e Substância Gelatinosa. Em 1980, Meskey relatou que a injeção

de morfina na SCPD ativava neurônios do NMR. Outros trabalhos relataram que a estimulação elétrica da SCP causava pronunciada analgesia, e a naloxona suprimia a ação analgésica tanto da morfina como da estimulação, o que sugeriu a presença de opioides endógenos no encéfalo (ALVES NETO et al., 2009; FENG et al., 2012; LIEBESKIND, 1974 apud FENG et al., 2012; MARTINS et al., 2012).

A elevada concentração de receptores opioides no sistema límbico e o efeito de euforia desencadeado pela ativação dos mesmos tem relacionado ação significativa desses neurotransmissores no sistema de recompensa e no controle do humor, despertando o interesse em pesquisas como opção viável para o tratamento dos transtornos mentais. A maioria dos estudos que vinham sendo realizados voltavam-se apenas para o tratamento da adição, principalmente nos Estados Unidos na era Nixon, que combatia o abuso de heroína, criando centros de pesquisas de opioides (FENG et al., 2012; HÖKFELT; BARTFAI; BLOOM, 2003; JONES, 2004; LUTZ; KIEFFER, 2013; MARTINS et al., 2012; RANG; DALE, 2004).

Ratos *knockout* para os receptores μ , δ , κ têm sido utilizados para pesquisar a interferência dos opioides no humor e dependência de fármacos psicoativos. Receptores μ parecem estar fortemente relacionados com sistemas de recompensa, o que o relaciona ao abuso de drogas, embora resultados paradoxais tenham sido encontrados em animais μ *knockout* em relação ao papel de regulação das respostas emocionais. Resultados experimentais indicam uma diminuição da ansiedade nesses animais, porém comportamentos depressivos associados estão presentes, o que mostra que os mecanismos de ação dos receptores μ sobre o humor são mais complexos do que a farmacologia tem mostrado. Os animais *knockout* para receptores δ apresentaram comportamentos de ansiedade e depressão claros. Em pesquisas sobre a dependência química está bem estabelecido que a ativação do receptor κ diminui a recompensa, confirmando que a atividade deste receptor é contrária à atividade dos receptores μ . Tem-se demonstrado um aumento da atividade κ por vários estressores, como no Teste do Nado Forçado e Teste da Derrota Social (LUTZ; KIEFFER, 2013; FENG et al., 2012).

De acordo com a revisão de Lutz e Kieffer (2013), é evidente que os três tipos de receptores opioides agem de maneiras distintas nas respostas a estímulos estressores (Figura 5) e no controle das emoções, podendo exercer papéis importantes nos transtornos de ansiedade. Feng e colaboradores (2012), em sua revisão, afirmam que o papel dos opioides no que diz respeito às emoções,

apresentam pobreza de documentação na farmacologia. Achados científicos encontraram uma ação ansiolítica e antidepressiva de agonista dos receptores δ em testes animais, outros estudos com animais expostos a estímulos aversivos apresentaram variações nas neurotransmissões mediadas pelos receptores μ , e ainda alguns estudos em animais submetidos a estímulos estressores e à morfina apresentaram ativação dos receptores κ (LUTZ; KIEFFER, 2013; FENG et al., 2012).

Lutz e Kieffer (2013), em revisão sobre tal tema sintetizam que receptores δ medeiam uma melhora do humor, os receptores μ têm efeitos contrastantes sobre o humor e os receptores κ diminuem o humor após exposição a estressores. Roy-Byrne e colaboradores (2013) em ensaio clínico com 1004 pacientes com distúrbios de ansiedade identificaram que os pacientes do ensaio que tinham dor como comorbidade e recebiam medicação opioide apresentavam níveis de ansiedades mais baixos.

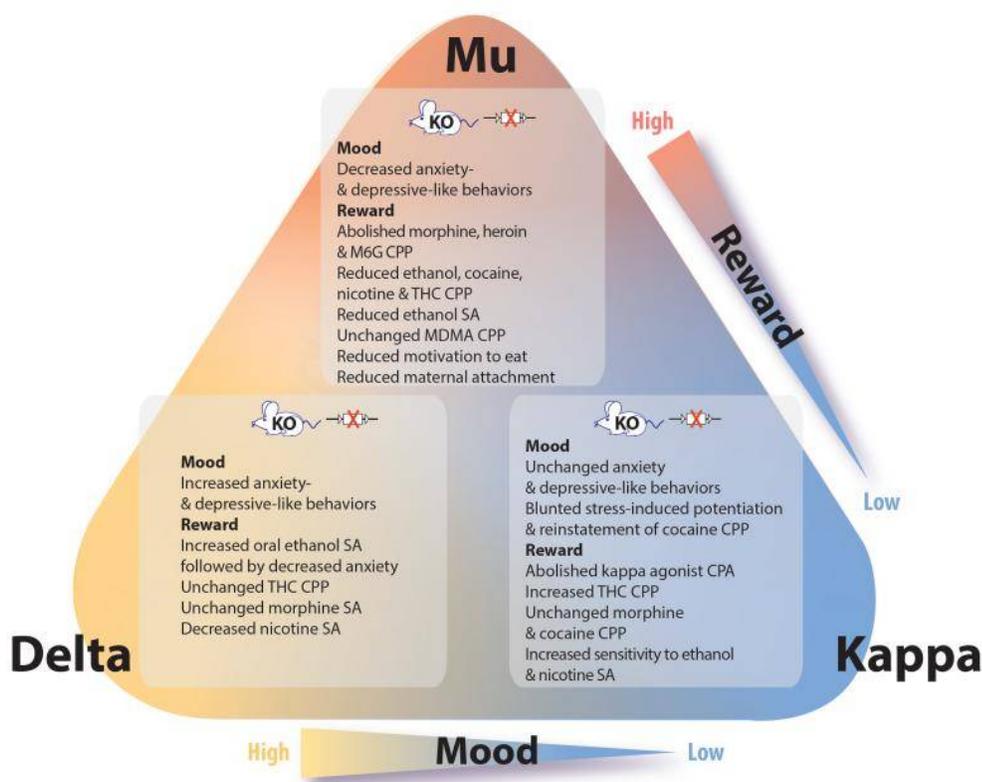


Figura 5 – Envolvimento dos receptores opioides nos mecanismos de recompensa e nas manifestações de ansiedade e depressão. Fonte: Lutz e Kieffer (2013).

Tratamentos farmacológicos dos transtornos de ansiedade

O tratamento medicamentoso da ansiedade iniciou-se no século XIX com os brometos que eram altamente tóxicos. Em 1949, John Cade, através de experimentos, introduziu o uso do Lítio para mania e depressão. Em 1950, o cirurgião Laborit utilizou anti-histamínicos (clorpromazina) no pós-operatório de seus pacientes e percebeu que eles ficavam calmos. Assim, sugeriu a utilização da droga para o tratamento de distúrbios mentais. Em 1950, os antidepressivos tricíclicos (ADTs) foram uma opção terapêutica para ansiedade. O haloperidol foi descoberto por Paul Janssem em 1958 e os ensaios clínicos realizados até 1967 permitiram sua utilização para tratamento das manias e esquizofrenia. A imipramina, também em 1958, foi apontada por Thomas Kuhn como ADT. Em 1958, Nathan Kline, em seus estudos, percebeu o efeito dos inibidores de monoaminaoxidase (IMAO) sobre a ansiedade. Em 1960 o químico Sternbach, dos laboratórios Roche, inaugurou a era dos BZDs, com a introdução do clordiazepóxido, para tratamento dos diferentes subtipos de ansiedade. As pesquisas com animais experimentais em modelos destinados à avaliação de comportamento levaram à verificação dos efeitos ansiolíticos de outros BZDs, o que possibilitou seu amplo uso até 1970, com posterior declínio após a comprovação da dependência causada nos pacientes. Em 1986, uma classe de ansiolítico não BZDs, a buspirona, foi sintetizada por Wu e Rayburn, com menores efeitos adversos do que os de BZDs, não demonstrando potencial de abuso. A taxa elevada de efeitos adversos que apresentavam os ADTs pareciam minimizados nos ISRSs. Estudos sobre essa classe de ansiolíticos têm sido realizados, e estes vêm substituindo os ADTs com níveis de segurança, eficácia e tolerabilidade melhores (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GABBARD, 2009; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; KAPLAN; SADOCK; GREBB, 1997; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

Ao que mostram as pesquisas e a história da psicofarmacologia, de 1950 até os dias de hoje, muitos foram os avanços nesta área, e o arsenal terapêutico da psicofarmacologia tem sido abordado não só para o tratamento dos transtornos mentais, mas também para a compreensão de regiões anatômicas envolvidas e suas manifestações funcionais através do comportamento, ampliando o conhecimento do limite biológico (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GABBARD, 2009;

GRAEFF; GUIMARÃES 2012; KAPLAN; SADOCK; GREBB, 1997; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

Segundo o National Institute of Mental Health (2016b), as medicações ansiolíticas auxiliam na redução dos sintomas de ansiedade relacionados a ataques de pânico, medo ou preocupação excessiva. No TAG há evidências que sugerem indicação dos BZDs como terapêutica eficiente para o transtorno. Isso foi demonstrado por metanálise, na qual se comparou a ação dos BZDs à da buspirona, mostrando que ambas as drogas foram eficazes no tratamento da TAG em curto prazo (MITTE et al., 2005). Estudos conduzidos em laboratórios utilizando ratos com injeção intra-SCPD demonstraram mecanismos GABAérgicos modulando a ansiedade na SCPD e efeitos ansiolíticos relacionados aos BZDs (BRANDÃO; GRAEFF, 2014; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; MITTE et al., 2005; MORENO; MORENO; SOARES, 1999; RAVINDRAN; STEIN, 2010; SANT'ANA et al., 2016). O guia prático de tratamento de paciente com TP da APA tem indicado o uso de BZD, sendo o alprazolam o primeiro dos BZDs aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para este fim. Ensaio clínico têm demonstrado eficácia do alprazolam na redução da frequência dos ataques de pânico, na atenuação da evitação fóbica e ansiedade antecipatória, assim como o clonazepam, também aprovado pelo FDA, tem sido eficiente para o TP. O uso conjunto de BZDs e ISRSs tem mostrado antecipação da melhora clínica em comparação ao uso único do ISRS isoladamente (MITTE et al., 2005; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

Os benzodiazepínicos, como alprazolam, clonazepam e lorazepam são usados no tratamento do TAG e TP. Estudos experimentais mais recentes utilizando o LTE têm confirmado as atividades ansiolítica e panicolítica do alprazolam (SANT'ANA et al., 2016).

Marchesi (2008), numa revisão sobre medicações para tratamento do TP, relata que os BZDs, ISRSs e IMAOs foram eficazes em relação ao placebo no tratamento do TP, promovendo alívio da ansiedade, diminuição da atividade motora, indução do sono, relaxamento muscular, desinibição comportamental e atenuação do comportamento defensivo.

Em relação aos efeitos da imipramina, um ADT, Donald Klein evidenciou melhora de pacientes com TP através do tratamento crônico com esse fármaco (KLEIN, 1964). Segundo seus relatos, os pacientes tinham uma exacerbação da ansiedade nas primeiras semanas, e após três semanas os pacientes apresentavam

redução da ansiedade. Estudos têm mostrado o efeito dos ADTs nos transtornos de ansiedade por meio de mecanismos serotoninérgicos. Zanoveli, Nogueira e Zangrossi (2005), evidenciaram que a imipramina crônica prejudicou a fuga no LTE, comportamento que tem sido relacionado a um efeito panicolítico, além disso, relataram uma potencialização do efeito anti-fuga de agonistas 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} com o uso crônico da imipramina. De acordo com Marchesi (2008), as desvantagens, comparando os ISRSs aos ADTs, é que os ADTs desencadeiam efeitos colaterais como sudorese, ganho de peso, distúrbios cognitivos e sintomas relacionados aos efeitos anticolinérgicos, como boca seca, taquicardia, retenção urinária e constipação intestinal. Diante desses fatores, os ISRSs, como fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram e escitalopram têm sido a medicação utilizada preferencialmente no tratamento dos transtornos de ansiedade.

Há fortes evidências de que o uso crônico dos ISRSs é capaz de inibir mecanismos regulatórios de liberação da 5-HT na fenda sináptica da seguinte maneira: a disponibilidade desse neurotransmissor se dá após sua síntese em neurônios serotoninérgicos a partir do aminoácido triptofano e da ação da enzima triptofanhidroxilase (TH), a qual possui duas isoformas, TH1 e TH2, sendo a TH2 mais comum nos terminais neuronais serotoninérgicos. O armazenamento da 5-HT sintetizada em vesículas no neurônio pré-sináptico é mediado por uma monoamina vesicular (SLC18A2). Um potencial de ação cálcio dependente estimula a secreção da 5-HT na fenda sináptica, que irá se ligar a receptores pré e pós-sinápticos. A ligação da serotonina a receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} atenua a secreção de serotonina na fenda sináptica. Este mecanismo de *feedback* então regula a concentração de serotonina na fenda sináptica e sua distribuição em receptores pós-sinápticos. O uso crônico dos ISRSs modula a expressão de receptores, por aumentar a disponibilização de serotonina na fenda sináptica (SANGKUHL; ALTMAN, 2009).

Há varias hipóteses sendo estabelecidas acerca dos motivos pelos quais essa medicação pode interferir na disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica. Uma delas diz respeito ao transportador de serotonina (SCL6A4), responsável por recaptar a 5-HT secretada para os receptores pré-sinápticos. Há evidência que um dos alvos moleculares dos ISRSs é a molécula transportadora (SCL6A4), com a qual os ISRSs têm grande afinidade, ligando-se a ela, o transporte de 5-HT para os receptores pré-sinápticos seria impedido, assim diminuindo a recaptação

disponibiliza-se uma maior concentração e distribuição de 5-HT nos receptores pós-sinápticos. A observação clínica tem sugerido que há um período de adaptação a essas alterações de 2 a 4 semanas para que haja níveis elevados de 5-HT disponíveis na fenda que resultem em resultado clínico (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; RANG; DALE, 2004; SANGKUHL; ALTMAN, 2009).

Embora os resultados com os ISRSs sejam positivos, o abandono do tratamento é comum devido a demora para a obtenção do alívio da ansiedade e a exacerbação dos sintomas da ansiedade no início do tratamento (BARBUI et al., 2007). Fato este contornado com a associação dos BZDs. No entanto, drogas BZDs podem induzir à dependência, conforme já mencionado. Além disso, existem muitos casos relatados de resistência ao tratamento, ou seja, não existe instalação dos efeitos benéficos dos ISRSs (MITTE et al., 2005; RAVINDRAN; STEIN, 2010). Considerando os argumentos mencionados anteriormente que apontam uma possível interação entre sistema serotoninérgico e opioidérgico, pressupõe-se que a introdução de um fármaco opioide poderia minimizar esses problemas relacionados com o uso de ISRSs no tratamento dos transtornos de ansiedade.

Buprenorfina: possível alternativa no tratamento dos transtornos de ansiedade

A Buprenorfina, um opioide sintético derivado da tebaína, alcaloide extraído da *Papaver somniferum*, popularmente conhecida como papoula, é agonista parcial μ , pois apresenta alta afinidade por esses receptores, porém baixa atividade intrínseca, é antagonista de receptores κ (Figura 6), apresentando também afinidade a receptores δ . Tem sido de grande valia no tratamento da dor e no tratamento de adição a substâncias psicoativas. Efeitos ansiolíticos e antidepressivos são atribuídos ao antagonismo κ , e os efeitos analgésicos são mediados pela ativação dos receptores μ (GLOVER; DAVIS, 2008; KARP et al., 2014; LIKAR, 2006; VIRK et al., 2009; YAMAMOTO; SHONO; TANABI, 2006).

Esse fármaco é mais potente que a morfina, pois a dose de 0,4 mg dela tem equivalência analgésica a 10mg de morfina. O pico de concentração sanguínea para administração oral da Buprenorfina é de 1 a 2 horas, e para a administração intramuscular ou intravenosa é de 5 minutos. A meia-vida de dissociação desse opioide é de 166 minutos, o que sugere que seus níveis plasmáticos não

acompanham as manifestações fisiológicas, sendo que a meia-vida plasmática é de aproximadamente 3 horas e isso não guarda relação com o desaparecimento dos efeitos. Seus metabólitos são excretados na urina e nas fezes. Esse fármaco é metabolizado pela CYP3A4 no fígado para norBuprenorfina, que pode exercer ação farmacológica de analgesia mínima (LIKAR, 2006). Causa sintomas mínimos de abstinência e estes, quando aparecem, são tardios, não são tão graves e desaparecem em 1 a 2 semanas (BRUNTON; CHARNER; KNOLLMANN, 2012; RANG; DALE, 2004).

Virk e colaboradores (2009) relataram que a Buprenorfina apresenta uma curva dose-efeito em forma de sino, o que indica que as doses baixas têm efeito e que doses tetos, responsáveis por desencadear um efeito de depressão respiratória, não precisam ser alcançadas. O fato de pequenas doses produzirem efeitos esperados confere segurança em relação aos efeitos indesejáveis, tornando-a mais segura. Virk e colaboradores (2009) citam que a Buprenorfina inibe a dessensibilização dos receptores opioides, por ter uma cinética lenta de associação e dissociação do receptor o que impede a tolerância comum aos opioides, e o fato de ser um agonista parcial μ confere uma incapacidade de desencadear disforia. Essas características únicas da Buprenorfina distinguem-na de outros opioides, o que denota sua relevância na clínica.

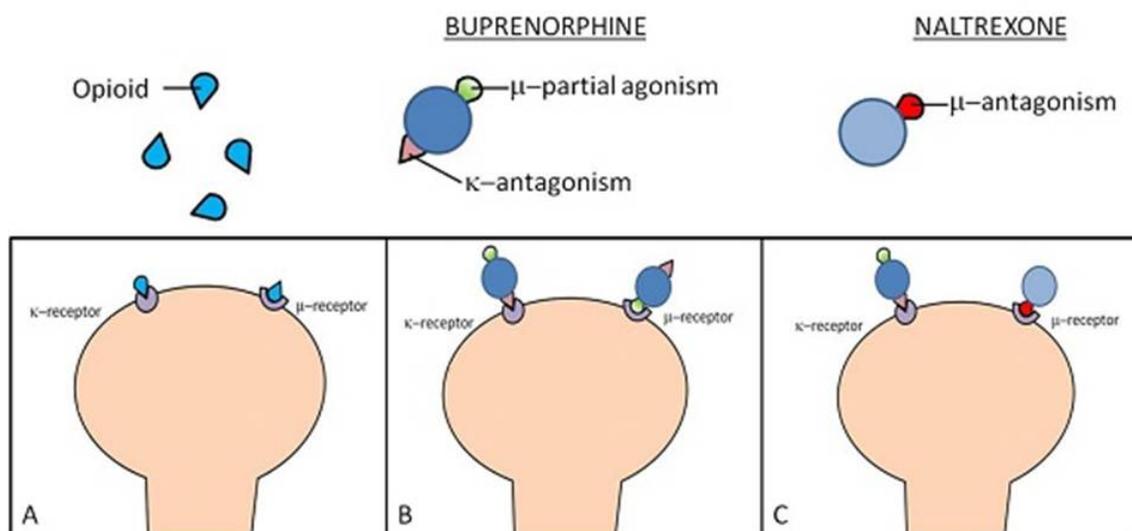


Figura 6 - Ação da Buprenorfina sobre receptores κ e μ . Fonte: Laboratoires Servier, 2016.

A eficácia da ação analgésica da Buprenorfina tem sido constatada em vários estudos realizados tanto em animais de laboratório (ALMATROUDI et al., 2015; CURTIN et al., 2009; YAMAMOTO; SHONO; TANABE, 2006), como em animais domésticos (SANTANA et al., 2010; STEAGALL, 2009), como também em humanos (KHANNA; PILLARISSETTI, 2015).

Já se evidenciou o papel da Buprenorfina nos transtornos da ansiedade em um experimento utilizando ratos de Kyoto, animais considerados modelos genéticos para ansiedade e depressão, que não responderam a tratamentos com ISRSs e aos agonistas de 5-HT. Browne, Nest e Lucki (2015) encontraram uma diminuição dos comportamentos de ansiedade e depressão nos Teste de Transição Claro- Escuro e Teste do Nado Forçado, respectivamente, 24 horas após a administração subcutânea aguda de Buprenorfina. Glover e Davis (2008) relataram que tanto a morfina quanto a Buprenorfina foram capazes de diminuir a expressão de sobressalto potencializado pelo medo, em ratos, sendo que a Buprenorfina foi 40 vezes mais potente que a morfina. Falcon e colaboradores (2015) verificaram um efeito ansiolítico e antidepressivo resultante da administração por microdiálise de Buprenorfina no *Núcleo accumbens*, de ratos o que eles relacionaram ao antagonismo kappa opioide da droga. 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 tratado com placebo.

Diante do exposto, e considerando aspectos cruciais nesta abordagem como:

1. Efeitos colaterais provocados pelos BZDs com potencial para dependência e abuso;
2. Demora na instalação dos efeitos ansiolíticos dos ISRSs;
3. Ocorrência de exacerbação dos sintomas de ansiedade no início do tratamento com ISRSs;
4. Resistência ao estabelecimento dos efeitos benéficos dos ISRSs apresentada por muitos pacientes, conforme já mencionado anteriormente, o que leva muitas vezes ao abandono da terapêutica instituída (BARBUI et al., 2007), este trabalho indaga se a Buprenorfina poderia ser um fármaco com propriedades ansiolíticas e panicolíticas.

A hipótese proposta é que a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ e antagonista de receptores κ , possa ser um recurso farmacológico viável por atenuar o potencial de dependência e os efeitos adversos de agonistas plenos dos

receptores opioides, possibilitando uma nova estratégia terapêutica para o TAG e TP.

No entanto, a única forma de apresentação da Buprenorfina no Brasil são adesivos transdérmicos de nome comercial Restiva, de 5mg, que libera 5 microgramas/hora de Buprenorfina, 10mg, que libera 10microgramas/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. Após inúmeras tentativas de importação do fármaco, foram feitos alguns ensaios experimentais utilizando os adesivos. Inicialmente foram aplicados os adesivos sobre a pele dos animais, após tricotomia. Entretanto, como os animais não deveriam ficar em separação social, comiam os adesivos dos outros animais alocados na mesma caixa. Optou-se então por implantar os adesivos cirurgicamente sob a pele dos animais. A desvantagem de tal procedimento consistia em uma elevada liberação do fármaco, prejudicando os resultados dos testes. Nesse caso ainda, após um tempo maior de alojamento os animais retiravam os pontos uns dos outros, muitas vezes removendo até mesmo o adesivo implantado. Foi então realizada uma extração da droga dos adesivos, e liofilização da mesma, possibilitando a administração nos animais por via intraperitoneal (IP). Todos os procedimentos experimentais realizados foram descritos no artigo científico sequencialmente descrito.

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a manifestação de comportamentos defensivos de animais submetidos ao LTE, ao Teste de Transição Claro-escuro e ao Teste do Campo Aberto após implante subcutâneo do adesivo com Buprenorfina ou após a administração sistêmica aguda de Buprenorfina extraída dos adesivos, visando investigar seu potencial ansiolítico e panicolítico. Com o objetivo de verificar se o implante subcutâneo do adesivo de Buprenorfina, bem como o extrato da Buprenorfina a partir dos adesivos continham o composto ativo, foi introduzido um teste de analgesia prévio como parâmetro da eficácia do fármaco para a realização segura das análises comportamentais.

REFERÊNCIAS

- ALMATROUDI, A. et al. Combined administration of buprenorphine and naltrexone produces antidepressant-like effects in rat. **J Psychopharmacol**, v. 29, n. 7, p. 812-821, 2015.
- ALVES NETO, O. et al. **Dor: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- 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.
- ANDRADE, L. H. et al. Mental Disorders in Megacities: Findings from the São Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2012.
- ANDRADE, T. G.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **J Psychopharmacol**, v. 27, p. 1107-1115, 2013.
- BARBUI, C. et al. WITHDRAWN: Treatment discontinuation with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) versus tricyclic antidepressants (TCAs). **Cochrane Database Syst Rev**, v. 18, n. 3, 2007.
- BERSHAD, A. K. et al. Opioid partial agonist buprenorphine dampens responses to psychosocial stress in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 281-288, 2015.
- BLANCHARD, C.; SUMMERS, C. H.; BLANCHARD, R. J. The Role of Behavior in Translational Models for Psychopathology: Functionality and dysfunctional behaviors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 8, p. 1567-1577, 2013.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 205-218, 2001.
- BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, Issues 1-2, p. 155-165, 1993.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. An ethoexperimental approach to the study of fear. **Psychol Rec**, v. 37, n. 3, p. 305-316, 1987.
- BRANDÃO, M. L. et al. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 25, suppl. 2, p. 36-41, 2003.
- BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.
- BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G. **Neurobiologia dos transtornos mentais**. São Paulo: Atheneu, 2014.

BRASIL. Ministério da Previdência Social. **Acompanhamento mensal dos benefícios auxílios-doença acidentários, concedidos segundo os códigos da CID-10** – Janeiro a Junho de 2016. Brasília, DF, 26 jul. 2016. Disponível em: <http://www.previdencia.gov.br/wp-content/uploads/2016/08/cid10_2016.01-05_acid.pdf>. Acesso em: 14 set. 2016.

_____. 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., 15 de maio de 1998. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29PRT_SVS_344_1998_COMP.pdf/f7c0dfd5-b16a-4077-b32c-d421f431c6e7>. Acesso em: 14 set. 2016.

BROWNE, C. A.; NEST, D. V.; LUCKI, I. Antidepressant-like Effects of Buprenorphine in Rats Are Strain Dependent. **Behav Brain Res**, v. 278, p. 385-392, 2015.

BRUNTON, L. L.; CHARNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 35, suppl. 2, p. S101-S111, 2013.

CANTERAS, NS. Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. In: Blanchard DC, Blanchard RJ, Griebel G, Nutt D, editors. **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Academic Press; p.124-40, 2008.

CARVALHO-NETTO, E. F. Medo e ansiedade: aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 62-65, 2009.

COLASANTI, A. et al. Opioids and anxiety. **J Psychopharmacol**, v.25, p. 1415-1433, 2011.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 13, p. 167-70, 1980.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological Analysis of Rat Behavior on the Elevated Plus-Maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

CRUZ, A. P. de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J; FUKUSHIMA, S. (Orgs.). **Métodos em neurociência**. São Paulo: Manole, 2012. p. 192-217

CURTIN, L. I. et al. Evaluation of Buprenorphine in a Postoperative Pain Model in Rats. **Comparative Med**, v. 59, n. 1, p. 60-71, 2009.

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

FARAVELLI, C. et al. The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. **Curr Pharmac Des**, v. 18, p. 5663-5674, 2012.

FENG, Y. et al. Current Research on Opioid Receptor Function. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 230-246, 2012.

GABBARD, G. O. **Psiquiatria psicodinâmica na prática clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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. **J Psychopharmacol**, v. 198, p. 167-180, 2008.

GRAEFF, F. G. Ansiedade experimental humana. **Rev Psiq Clín**, São Paulo, v. 34. n. 5, p. 251-253, 2007.

_____. Serotonina, substância cinzenta periaquedutal e transtorno do Pânico. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 25, supl. 2, p. 42-45, 2003.

GRAEFF, F. G. et al. Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **An Acad Bras Ciênc**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 477-491, 2005.

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

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 67-70, 1993.

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

HARIRI, A. R. et al. Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. **Science**, v. 297, Issue 5580, p. 400-403, 2002.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B. A. The mouse light-dark paradigm: a review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 141-66, 2001.

HETEM, L. A.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004.

HÖKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM, F. Neuropeptides: opportunities for drug Discovery. **The Lancet Neurology**, v. 2, p. 463-472, 2003.

JONES, H. E. Practical Considerations for the Clinical Use of Buprenorphine. **Sci Pract Perspect**, v. 2, n. 2, p. 4-20, 2004.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B.J.; GREBB, J. A. **Compêndio de Psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica**. 7. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

KARP, J.F. et al. Safety, Tolerability, and Clinical Effect of Low-Dose Buprenorphine for Treatment-Resistant Depression in Midlife and Older Adults. **J Clin Psychiatry**, v. 75, n. 8, p. 785-793, 2014.

KHANNA, I. K.; PILLARISSETTI, S. Buprenorphine – an attractive opioid with underutilized potential in treatment of chronic pain. **J Pain Res**, v. 8, p. 859-870, 2015.

KLEIN, D. F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. **J Psychopharmacol**, v. 5 p. 397-408, 1964.

KOSTERLITZ, H. W.; PATERSON, S. J. Characterization of opioid receptors in nervous tissue. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 210, n. 1178, p. 549-556, oct. 1980.

LABORATOIRES SERVIER. Disponível em: <<http://www.servier.com/>>. Acesso em: 10 set. 2016.

LEVITA, L. et al. The Behavioural Inhibition System, anxiety and hippocampal volume in a non-clinical population. **Biol Mood Anxiety Disord**, v. 4, n. 1, 2014.

LIKAR, R. Transdermal buprenorphine in the management of persistent pain – safety aspects. **Ther Clin Risk Manag**, v. 2, n. 1, p. 115-125, 2006.

LUTZ, P. E.; KIEFFER, B. L. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 3, p. 195-206, 2013.

MARCHESI, C. Pharmacological management of panic disorder. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 4, n. 1, p. 93-106, 2008.

MARTINS, R. T. et al. Receptores opioides até o contexto atual. **Rev Dor**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.

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

MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 21, p. 24-40, 1999.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH - NIMH. **Anxiety Disorders**. Bethesda, 2016a. Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/anxiety-disorders/index.shtml>>. Acesso em: 9 set. 2016.

_____. **Mental Health Medications**. Bethesda, 2016b. Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/mental-health-medications/index.shtml>>. Acesso em: 25 out. 2016.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Rev. Latinoam Psicopat Fund**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 528-543, 2014.

OLIVEIRA, A. A. **Mémoria: Cognição e comportamento**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2007.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Remoção das vibrissas não afeta as respostas comportamentais de ratos Lewis E SHR. In: REUNIÃO ANUAL DA FeSBE, 22., 2007, Águas de Lindóia, SP. **Anais...Águas de Lindóia, SP: FeSBE**, 2007.

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. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p.149-167, 1985.

PINHEIRO, S. H. et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **An Acad Bras Ciênc**, v. 79, n. 1, p. 71-85, 2007.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, p. 3-33, 2003.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI-JR., H.; VIANA, M. B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 147, p. 185-192, 2003.

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. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 839-854, 2010. Disponível em: <<http://www.psychiatrist.com/JCP/article/Pages/2010/v71n07/v71n0705.aspx>>. Acesso em: 4 out. 2016.

RIBAS, G. C. As bases neuroanatômicas do comportamento: histórico e contribuições recentes. **Rev Bras Psiquiatr**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 63-71, 2007.

RONCON, C. M. et al. Cooperative regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors in the rat periaqueductal grey matter by 5-HT_{1A} and μ -receptors. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 12, p. 1141-1148, 2013.

ROY-BYRNE, P. et al. Effects of pain and prescription opioid use on outcomes in a collaborative care intervention for anxiety. **Clin J Pain**, v. 29, n. 9, p. 800-806, 2013.

SADOCK, B. J.; SADOCK V. A. **Compêndio de psiquiatria: Ciência do comportamento e psiquiatria clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SANGKUHL, K.; ALTMAN, R. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) Pathway. **Pharmacogenet Genomics**, v. 19, n. 11, p. 907-909, 2009.

SANT'ANA, A. B. et al. Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 315, p. 115-122, 2016.

SANTANA, L. A. et al. Efeitos antinociceptivos e sedativos da Buprenorfina, da acepromazina ou da associação Buprenorfina e acepromazina em gatos. **Cienc Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2122-2128, out. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782010001000011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 abr. 2015.

SILVA, L. C. C. P. et al. O uso de animais de laboratório como modelos experimentais para o estudo de Transtornos Psiquiátricos. **RESBCAL**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 270-278, 2012.

STEAGALL, P. V. M. **Efeitos antinociceptivos dose-resposta e de diferentes vias de administração da Buprenorfina em felinos domésticos**. 2009. 77 f. Tese (Doutorado anestesiologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Opioid Receptor Subtypes Differentially Modulate Serotonin Efflux in the Rat Central Nervous System. **J Pharm Exp Ther**, v. 303, n. 2, p. 549-556, 2002.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI-JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, p. 571-576, 2000.

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

_____. Cortisol awakening response in drug-naïve panic disorder. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 12, p. 1581-1585, jun. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Mental Health Action Plan 2013-2020**. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/89966/1/9789241506021_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 set. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Mental Health Atlas 2014**. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/178879/1/9789241565011_eng.pdf>. Acesso em: 11 set. 2016.

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. **J Pharm Exp Ther**, v. 318, n. 1, p. 206-213, 2006.

YERKES, R. M.; DODSON, J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. **J Comp NeurolPsychol**, v. 18, Issue 5, p. 459-482, 1908.

ZANGROSSI, H., GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**, 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. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46, n. 3, p. 397-406, 2014.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI JR., H. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behav Pharmacol**, v. 16, n. 7, p. 543-552, 2005.

**ARTIGO: EFEITO SISTÊMICO DA BUPRENORFINA NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE
GENERALIZADA E COM O PÂNICO**

O artigo aqui apresentado foi redigido conforme as normas da revista *Journal of Psychopharmacology*, exceto pelo posicionamento das Figuras e Tabelas. De acordo com as normas da revista, para a submissão, todas 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 OPIODÉRGICA E SEROTONINÉRGICA NO TRANSTORNO DO PÂNICO: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO FARMACOLÓGICO”.

RESEARCH REPORT**EFEITO SISTÊMICO DA BUPRENORFINA NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE
GENERALIZADA E COM O PÂNICO****SYSTEMIC EFFECT OF BUPRENORPHINE IN THE MODULATION OF THE
DEFENSIVE BEHAVIOURS RELATED TO GENERALIZED ANXIETY AND PANIC*****Short Title – Buprenorfine and generalized anxiety and panic***

Maria Eulália Baleotti², Paloma Molina Hernandez², Mariane Cariati Tirapelle², Ariela de Oliveira Pedro Bom², Josimari Cristiane Tiemann Araújo², Elisabeth Aparecida Audi³, Frederico Guilherme Graeff⁴, Hélio Zangrossi Junior⁵, Telma Gonçalves Carneiro Spera de 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.br

Resumo

Background: Fármacos antidepressivos como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS; exemplos: fluoxetina e escitalopram) são drogas de primeira escolha no tratamento dos Transtornos de Ansiedade Generalizada (TAG) e do Transtorno do Pânico (TP), devido a um menor potencial de gerar efeitos adversos (Baldwin et al., 2005). No entanto, apesar de eficazes na terapêutica, estes fármacos apresentam limitações no seu uso. Nesse sentido, há grande interesse na busca de novas estratégias de tratamento, identificando outros sistemas de neurotransmissão que possam estar relacionados à etiologia e, conseqüentemente, ao tratamento desses transtornos de ansiedade. Estudos prévios apontaram o envolvimento de opioides endógenos na modulação da ansiedade. O presente estudo tem por objetivo investigar o efeito da Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista de receptores κ -opioide, sobre a manifestação de comportamentos defensivos relacionados com o TAG e com o TP.

Métodos: Para isto foram conduzidos dois experimentos utilizando ratos wistar, em todos os experimentos foram realizados teste de analgesia e teste comportamentais (Labirinto em T Elevado-LTE, Campo Aberto e Teste de Transição Claro-Escuro). A droga utilizada foi a Buprenorfina, através de implante subcutâneo de adesivos ou em injeções intraperitoneais.

Resultados: A Buprenorfina nas doses e vias estudadas desinibiu o comportamento de esquivas inibitórias no LTE e o comportamento motor dos ratos no Teste do Campo Aberto, mas não afetou as fugas no LTE e nem outras manifestações comportamentais no Teste de Transição Claro-Escuro, exceto no implante do adesivo, quando se observou ansiólise nesse teste. Na administração por via IP,

esses resultados ocorreram em todos os testes, mas somente na reexposição, 24 horas após a primeira avaliação comportamental.

Conclusões: A Buprenorfina nas doses e vias estudadas apresentou efeito analgésico e desinibiu o comportamento de esquivas e o comportamento motor dos ratos, mas não afetou as fugas, o que indica seu envolvimento na modulação de comportamentos defensivos apenas relacionados com a manifestação da ansiedade generalizada.

Palavras-chave: Buprenorfina, Labirinto em T Elevado, Receptores opioides, Transtorno de ansiedade generalizada, Transtorno do pânico.

Introdução

Fármacos antidepressivos como os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS; exemplos: fluoxetina e escitalopram) são drogas de primeira escolha no tratamento dos Transtornos de Ansiedade Generalizada (TAG) e do Transtorno do Pânico (TP). No entanto, apesar de eficazes na terapêutica, estes fármacos apresentam limitações no seu uso, tais como: os efeitos desejados ocorrem somente após administração crônica, em torno de 3 a 4 semanas após o início do tratamento (Artigas et al., 1996), a proporção relativamente alta de pacientes que não respondem à medicação e o frequente aumento nos níveis de ansiedade deste pacientes no início do tratamento, levando à descontinuidade do uso destas drogas (Brawman-Mintzer e Lydiard, 1996; Grunhaus et al., 1988; Zohar e Westenberg, 2000).

Nesse sentido, há grande interesse na busca de novas estratégias de tratamento, identificando outros sistemas de neurotransmissão que possam estar relacionados à etiologia e, conseqüentemente, ao tratamento desses transtornos de ansiedade. Estudos prévios apontaram o envolvimento de opioides endógenos na modulação da ansiedade, em testes comportamentais (Roncon et al., 2012, Roncon et al., 2013). E também a formação de heterodímeros entre receptores 5-HT_{1A} e μ -opioide (Cussac et al., 2012).

Tao e Auberbach (2002) demonstraram uma ação modulatória distinta da ativação dos receptores μ, δ, κ sobre a neurotransmissão serotoninérgica no SNC, principalmente um aumento de secreção de 5-HT no NDR quando houve ativação dos receptores μ e δ em decorrência da ação de seus agonistas microinjetados nesta região, e uma diminuição da secreção de 5-HT com microinjeção de agonista κ no *Núcleo accumbens*, NMR e NDR.

Sabe-se que os peptídeos opioides endógenos e seus receptores são amplamente distribuídos em todo o eixo nervoso com intensa densidade em áreas do sistema límbico relacionadas com a manifestação da ansiedade (Emrich et al., 1982; Mansour et al., 1988; Milligan et al., 2004), e também com o mecanismo de ação dos ISRSs (Berrocso et al., 2009, 2009a; McNaughton; Gray, 2000). Já foram identificados receptores μ no Hipocampo, Núcleos Talâmicos e Hipotalâmicos, *Núcleo accumbens*, Corpo Estriado, SCP, Colículo Superior e Inferior e *Locus coeruleus*. Receptores δ , foram encontrados no Giro Denteado, *Núcleo accumbens*, Corpo Estriado, Amígdala, Hipocampo e Globo Pálido, e receptores κ no Neo Córtex, Giro Denteado, Núcleo Paraventricular Talâmico, *Núcleo accumbens*, Globo Pálido, Hipotálamo e SCP (Colasanti et al., 2011; Feng et al., 2012; Lutz e Kieffer, 2013; Mansour et al., 1988).

Na SCPD foram constatados receptores opioides dos subtipos μ , κ e δ . A estimulação de receptores μ nesta região leva a efeitos ansiolíticos, enquanto que a ativação dos receptores κ causa o efeito oposto (Lutz e Kieffer, 2013; Mansour et al., 1995, 1988; Motta et al., 1995; Morgan et al., 1998). Foi demonstrado que a administração intra-SCPD de baixas doses de morfina em ratos submetidos ao LCE causa efeito ansiolítico, que é bloqueado pelo pré-tratamento sistêmico com a naltrexona (Anseloni et al., 1999) ou com a naloxona (Motta e Brandão, 1993), ambos antagonistas de receptores opioides. Efeito ansiolítico também foi observado em ratos tratados localmente com o agonista seletivo de receptores μ -opioides, DAMGO, sendo que o pré-tratamento IP com naltrexona inibe esse efeito (Motta et al., 1995). No mesmo modelo experimental, a microinjeção na SCPD do agonista seletivo κ [*trans*-(\pm)-3,4-dicloro-*N*-metil-*N*-[2-(1-pirrolidinil) ciclohexil] benzenoacetamida] (U-50,488-H) (Motta et al., 1995), ou de altas doses de Morfina

(Anseloni et al., 1999; Motta e Brandão, 1993; Nobre et al., 2000) provocam efeito ansiogênico, inibido pela administração sistêmica de nor-binaltorfimina (nor-BNI), um antagonista preferencial para receptores κ (Anseloni et al., 1999; Motta et al., 1995; Nobre et al., 2000).

Estudos mais recentes mostraram que a naloxona, injetada sistemicamente ou diretamente na SCPD, foi capaz de antagonizar o efeito do tipo panicolítico no LTE promovido tanto pela administração crônica de fluoxetina como pela microinjeção de 5-HT diretamente na SCPD (Roncon et al., 2012), sugerindo que mecanismos opioides contribuem com a atividade inibitória da 5-HT nos neurônios da SCPD que modulam a fuga/pânico.

Na sequência desses estudos, Roncon et al. (2013) mostraram que a microinjeção intra-SCPD de morfina causa efeito tipo 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. Na mesma direção, 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. Além disso, a combinação de doses sub-eficazes de 5-HT e de morfina aumentou as latências de fuga no LTE, o que é indicativo de efeito panicolítico.

Ainda assim, procurando-se avaliar quais subtipos de receptores opioides estariam envolvidos nesses efeitos, Roncon et al., (2013) mostraram que o pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptores μ -opióide CTOP bloqueia o efeito panicolítico 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. As constatações de que receptores 5-HT_{1A} e μ -opiíide interagem de forma sinérgica são sustentados por evidências eletrofisiológicas obtidas previamente na SCPV. Kishimoto et al, (2001) mostraram que a ativação de receptores 5-HT_{1A} e μ -opioides inibe 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 serotoninérgicos reduzem o *binding* do agonista seletivo de μ -opiíide DAMGO, e receptores μ -opiíide na SCP, mas não afetam o *binding* do agonista seletivo de receptores δ -opiíides, o [3H]DPDPE (Allen et al., 1993). Corroborando e fortalecendo essas constatações, Cussac et al. (2012) mostraram, em estudo *in-vitro* na SCP, que receptores 5-HT_{1A} e μ -opiíides podem formar heterodímeros, isto é, formam complexos contendo os 2 receptores, podendo funcionar assim de maneira interdependente.

Todas essas informações em conjunto confirmam que de fato opiíides endógenos estão envolvidos na modulação das reações aversivas relacionadas com a manifestação da ansiedade (Coimbra et al., 1996; Coimbra e Brandão, 1997; Coimbra et al., 2000).

Com base em tais constatações, vislumbrou-se a possibilidade de se investigar uma nova estratégia terapêutica para o tratamento do TAG e do TP, com base no uso de drogas capazes de facilitar a sinalização mediada por opiíides endógenos. Espera-se que através da utilização de uma droga com perfil farmacológico mais seguro, característica de agonistas parciais, seja possível atenuar efeitos adversos sobrevividos do uso contínuo de agonistas plenos para os receptores μ -opiíides, tais como a euforia, a tolerância e a dependência (Pasternak e Pan, 2013; Thanawal et al., 2008; Tian et al., 2009; Wheeler-Cowan, 1991). É de

interesse também avaliar o potencial destas drogas em reduzir o tempo para o aparecimento do efeito ansiolítico e panicolítico de drogas antidepressivas, bem como minimizar o aumento da ansiedade no início do tratamento.

Nessa direção, a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e um antagonista de receptores κ -opioide, apresenta ação farmacológica distinta de agonista pleno, o que lhe configura maior possibilidade de escolha para o que se pretende. Por apresentar baixa atividade intrínseca sobre receptores μ a Buprenorfina é considerada um agonista parcial, evitando assim a tolerância, a dependência e o risco de abuso. Apresenta curva dose resposta em forma de sino sendo que a resposta máxima é inalterada com aumento das doses (Likar, 2006). É mais potente que a Morfina o que significa que doses baixas são capazes de alcançar respostas desejadas (Glover e Davis, 2008). Excluindo-se a necessidade de aumento da dose, e permitindo a utilização de baixas doses afasta-se a possibilidade de depressão respiratória, efeito comum associado a altas doses de agonistas opioides, conferindo segurança ao uso da Buprenorfina (Karp et al., 2014). Considerando-se tais aspectos a Buprenorfina tem sido muito utilizada no tratamento de adição, e seu potencial analgésico já está bem estabelecido (Feng et al., 2012; Glover e Davis, 2008; Likar, 2006; Lutz e Kieffer, 2013; Virk et al., 2009; Rosenblum et al., 2012; Roy-Byrne et al., 2013; Yamamoto et al., 2006).

Com base no conhecimento que a ativação de receptores κ tem sido relacionada com a manifestação de comportamentos defensivos relacionados com o aumento de ansiedade, a atividade antagonista da Buprenorfina sobre esses receptores poderia causar um possível efeito ansiolítico (Falcon et al., 2015; Feng et al., 2012; Lutz e Kieffer, 2013). Assim pergunta-se: será que a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioides e antagonista κ -opioide, pode ser um novo

recurso coadjuvante no tratamento do TAG e TP? A hipótese deste estudo é que a Buprenorfina administrada de forma sistêmica poderia causar efeito ansiolítico e panicolítico nos animais testados.

Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Buprenorfina administrada sistemicamente sobre a manifestação de comportamentos defensivos de esquivas e fugas no Labirinto em T Elevado (LTE), um teste, derivado do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Pellow et al., 1985) que permite avaliar, em um mesmo animal, as respostas de esquivas inibitórias e as respostas de fuga, que têm sido associadas, respectivamente, ao TAG e ao TP (para revisão sobre o LTE ver Moreira et al., 2013 e Zangrossi e Graeff, 2014). Visando confirmar a atividade farmacológica do composto ativo foi utilizado um teste de analgesia prévio como parâmetro para as análises comportamentais.

Métodos

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

Animais

Foram utilizados Ratos *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°C +/- 2°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 1 semana, sendo submetidos a manipulação somente 3 vezes por semana durante as trocas de caixas. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento visando minimizar o sofrimento animal. O projeto inicial 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).

Drogas

Foi utilizada a Buprenorfina, um agonista parcial de receptores μ -opioide e antagonista κ -opioide, amplamente usado no tratamento da dor. Foram usados adesivos de Buprenorfina (Zodiac), com nome comercial \textcircledR 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 Nº 344 (BRASIL, 1998).

Esta medicação é controlada e vendida por prescrição médica através de receita específica para entorpecentes e psicotrópicos. Após inúmeras tentativas de importação do fármaco, foram feitos alguns ensaios experimentais utilizando os adesivos. Como houve dificuldade para utilização desse método foram adotados dois procedimentos experimentais: o implante do adesivo e posteriormente extração do fármaco do adesivo e administração por via intraperitoneal (IP).

Teste de analgesia

Foi utilizado o teste de contorção em animais independentes para validação da eficácia da droga. O teste de contorção é um modelo químico de nocicepção que se baseia no número de contorções. Estas são seguidas por extensão dos membros inferiores, que ocorrem devido à irritação peritoneal provocada por injeção de ácido acético via IP (Silva et al., 2013; Whittle, 1964). Após jejum de 8 h, 27 h depois da cirurgia os animais receberam injeções (IP) de ácido acético a 6% (10mg/kg). Foi realizado o teste de contorção tanto nos animais que receberam implante de adesivo (Experimento 1), como também nos animais que receberam injeções IP de Buprenorfina (Experimento 2), 10 minutos após injeção de ácido acético. Foram analisados os seguintes comportamentos: frequência e tempo de contorções abdominais, auto-limpeza e levantamentos, e o número de quadrados percorridos pelo animal durante o teste.

Testes comportamentais

Os testes foram realizados em sala exclusiva para avaliação comportamental do Laboratório de Fisiologia (temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), 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 plástica e flanela.

Os aparelhos foram iluminados com uma lâmpada incandescente 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 (LTE)

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 foi circundado por paredes laterais (40 cm de altura) e estava disposto perpendicularmente aos dois outros braços abertos. Os braços abertos foram delimitados por uma proteção de madeira de 1 cm de altura, a fim de se evitar a queda dos animais. Após 2 dias consecutivos de “handling” (manuseio delicado do animal por 5 minutos/dia), vinte e quatro 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). Trinta segundos após o 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 (Fuga

1, Fuga 2 e Fuga 3) com intervalos de trinta 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 et al., 1993; Graeff et al., 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 foram 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.

Trinta segundos depois de finalizado o Teste do Campo Aberto os animais foram submetidos ao Teste de Transição Claro-Escuro por cinco minutos, exceto no Experimento 1 que foram animais independentes. 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.

Delineamento experimental

Foram desenvolvidos dois experimentos, o primeiro destinado à avaliação da Buprenorfina após implante dos adesivos e o segundo realizado após extração do fármaco dos adesivos. Cada um dos experimentos foi subdividido em duas partes, a saber, teste de analgesia e avaliações comportamentais (LTE, Teste do Campo Aberto, Teste de Transição Claro-Escuro).

Experimento 1 – Avaliação da Buprenorfina após implante dos adesivos

Cirurgia para implante dos adesivos

Sob efeito anestésico do 2,2,2-tribromoethanol (250/kg) (Fluka), foi feita tricotomia no dorso do animal. Após procedimento de antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 1% (PVPI) (Rioquímica), o animal foi acomodado em decúbito ventral. Foi realizada incisão sagital média na pele, do dorso do animal, na altura da 1ª vértebra cervical em sentido caudal de 2 cm. Após divulsão para separação dos tecidos, foi inserido o implante do adesivo de Buprenorfina de 6,25 cm², com a parte que libera a droga voltada para baixo. Após este procedimento a pele foi suturada com fio de algodão. Os animais controles passaram pelo mesmo

procedimento cirúrgico e receberam implante de adesivo de micropore (Fita Microporosa Bege Cremer (1,2 cm X 4,5 cm), com as mesmas dimensões do adesivo de Buprenorfina, sem a presença do fármaco.

Teste de analgesia

Grupos independentes de ratos foram implantados com o adesivo de Buprenorfina de 5mg. Os animais controles passaram pelos mesmos procedimentos com implante de adesivos de micropore. Foram avaliados no teste de contorção que foi realizado 27 horas após o procedimento cirúrgico para implante dos adesivos (controle n=7; experimentais n=8).

Testes comportamentais

Para os testes comportamentais, animais controles (n=8) e experimentais (n=7) foram manipulados (“handling”) no 1º e 2º dia. No 3º dia foi realizada cirurgia para implante do adesivo, no período da manhã, e confinamento no período da tarde. No 4º dia, 27 horas após a cirurgia, foram conduzidas as avaliações comportamentais, iniciando-se pelo LTE, seguindo-se pelo Teste do Campo Aberto. Nesse experimento o Teste de Transição Claro-Escuro foi conduzido em animais independentes. Esse conjunto de avaliações comportamentais foi repetido em mais dois momentos: 24 horas e também sete dias após o implante.

Experimento 2 – Efeito agudo da Buprenorfina sistêmica

Para extração da droga 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 solução

salina 0,9%, previamente lavado e enxaguado com água destilada, no volume de 30 ml para cada 10 mg. Esse recipiente foi fechado com papel filme plástico e alumínio, e colocado em banho-maria por 27 horas a uma temperatura de 37° a 40°C. Em seguida os adesivos foram colocados na borda do becker por 5 minutos para escorrer todo o líquido do mesmo. Após remoção dos adesivos, o becker com a solução foi colocado no congelador a -23° C, onde permaneceu até o congelamento completo do líquido.

Após o congelamento da solução extraída, o becker foi colocado em um liofilizador, sem o papel alumínio e com perfurações no papel filme, onde permaneceu a uma temperatura de -54° C por 53 horas. Após liofilização e obtenção do pó como princípio ativo, para cada 25 mg de extrato foi adicionado 10ml de solução salina 0,9%. Sequencialmente, o recipiente foi colocado no agitador à temperatura ambiente até ocorrer a completa diluição do concentrado, que foi armazenado em geladeira coberto com filme plástico e papel alumínio ao abrigo da luz.

Após a extração da Buprenorfina dos adesivos por meio da liofilização, animais receberam por via intraperitoneal (IP) Buprenorfina nas doses de 1,5 mg/kg (n=9), 3,0 mg/kg (n=9), 6,0 mg/kg (n=10). Ratos controle receberam salina (n=9).

Teste de analgesia

Dez minutos após as injeções de Buprenorfina IP (1,5 mg/kg n=5; 3,0 mg/kg n=5; 6,0 mg/kg n=5; ratos controle receberam salina n=9), os animais foram submetidos ao teste de contorção.

Testes Comportamentais

Em experimento independente, dez minutos após as injeções de Buprenorfina IP (1,5 mg/kg n=9; 3,0 mg/kg n=9; 6,0 mg/kg n=10). Ratos controle receberam salina (n=9). 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, procedimento este denominado de reexposição.

Análise dos dados

As latências de esquiva inibitória e de fuga foram submetidas à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas), tendo como fator independente o tratamento, e como medidas repetidas as diferentes exposições efetuadas (Linha de base, Esquiva1 e Esquiva 2 ou Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3), visando avaliar se houve efeito do tratamento e das repetições. Foram realizadas também análises independentes de cada esquiva e de cada fuga através da ANOVA de uma via. Quando houve efeito de um ou de ambos os fatores foram realizadas comparações múltiplas utilizando o teste *post hoc* de Duncan. Os resultados do teste de analgesia, bem como as avaliações de atividade motora e dos dados comportamentais no Teste de Transição Claro-Escuro foram analisados através da ANOVA (uma via), seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. Em todas as análises um “p” com um valor menor que 0,05 foi considerado significativo.

Resultados

Experimento 1 - Avaliação da Buprenorfina após implante dos adesivos

Teste de contorção

Na análise do efeito analgésico da Buprenorfina no teste de contorção, 27 horas após implante do adesivo no tecido subcutâneo, a ANOVA mostrou que houve uma redução no número de contorções no grupo com implante de Buprenorfina em relação ao grupo controle [$F_{(1,13)}=138,26$; $p=0,000$], como também na duração da manifestação desse comportamento [$F_{(1,13)}=5,07$; $p=0,042$]. Constatou-se também uma redução no número de apresentações de auto limpeza [$F_{(1,13)}=9,19$; $p=0,009$], e diferença fronteira em relação à duração desse comportamento [$F_{(1,13)}=4,50$; $p=0,054$]. Não se constatou modificações quanto à frequência [$F_{(1,13)}=0,84$; $p=0,378$] e duração dos levantamentos [$F_{(1,13)}=0,55$; $p=0,473$] e quadrados percorridos no Campo Aberto [$F_{(1,13)}=0,06$; $p=0,814$]. Esses dados podem ser visualizados através da Figura 1. O teste de Duncan mostrou um nítido efeito analgésico do implante de Buprenorfina, acompanhado por diminuição também do comportamento de auto-limpeza ($p<0,05$). A inibição da atividade motora em decorrência do ácido acético no abdômen não foi alterada pela ação da Buprenorfina.

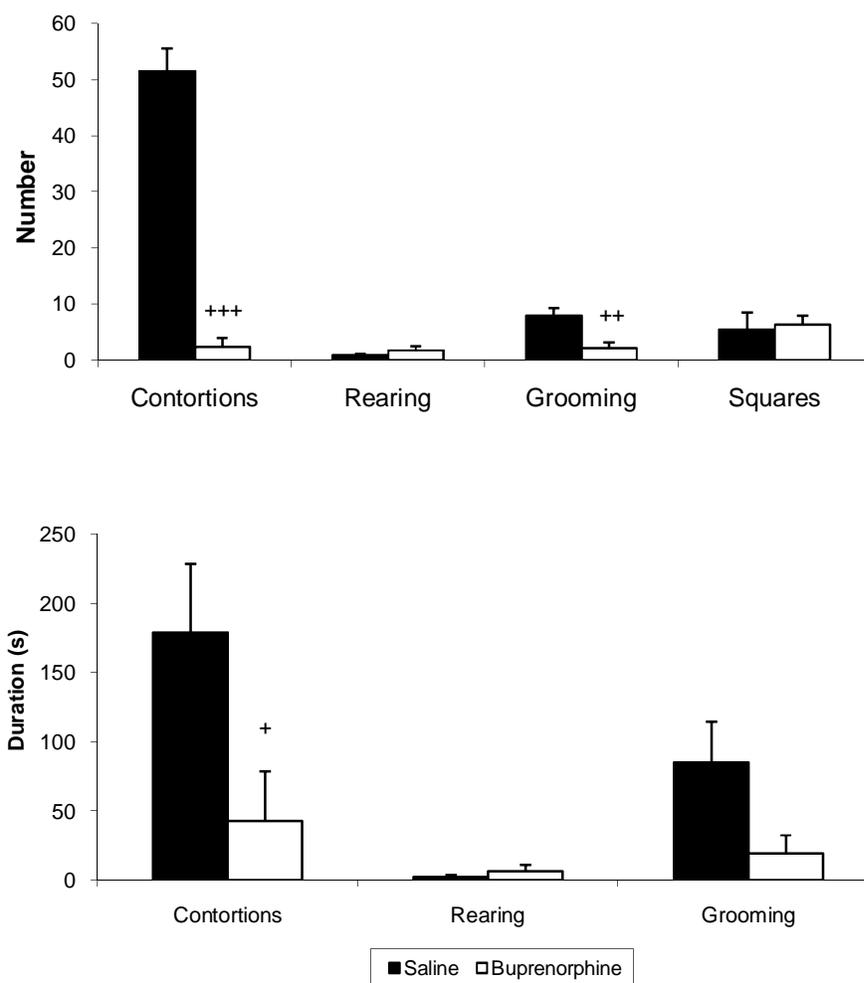


Figura 1. Média+EPM da frequência e duração das contorções, levantamentos, auto-limpeza e quadrados percorridos, apresentados por animais implantados com adesivo de Buprenorfina e seus controles. Anova seguida pelo teste *post hoc* de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ representam diferenças para com o grupo controle.

Labirinto em T elevado

Quanto à apresentação das esquivas no LTE (Figura 2) houve efeito do tratamento [$F_{(1,13)}=8,20$; $p=0,013$], como também efeito das repetições [$F_{(2,26)}=11,84$; $p < 0,001$] e interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(2,26)}=7,14$; $p=0,003$]. 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 prejudicou somente a E2 ($p < 0,01$).

Os animais, 24 horas após o primeiro teste, foram reexpostos ao LTE. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não se constatou efeito do tratamento [$F_{(1,13)}=4,63$; $p=0,051$], houve efeito das repetições [$F_{(2,26)}=4,36$; $p=0,023$], mas não se verificou interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(2,26)}=1,23$; $p=0,308$]. O teste de Duncan apontou que houve aumento na latência das esquivas apresentado pelos animais controles, caracterizando uma curva de aprendizagem ($p<0,05$). Mostrou também que a Buprenorfina prejudicou somente as esquivas na Linha de Base (LB) e na Esquiva 2 (E2) ($p<0,05$).

A análise do efeito da Buprenorfina sobre as esquivas inibitórias, 7 dias após o implante, mostrou que houve efeito do tratamento [$F_{(1,12)}=11,82$; $p=0,005$], não se verificou efeito das repetições [$F_{(2,24)}=1,39$; $p=0,267$], e constatou-se interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(2,24)}=0,73$; $p=0,492$]. Os animais controles apresentaram aumento das esquivas em todas as situações, caracterizando um efeito ansiogênico da reexposição. O teste de Duncan e as análises através da ANOVA de uma via em cada esquiva apontaram que a Buprenorfina prejudicou as três esquivas ($p<0,05$).

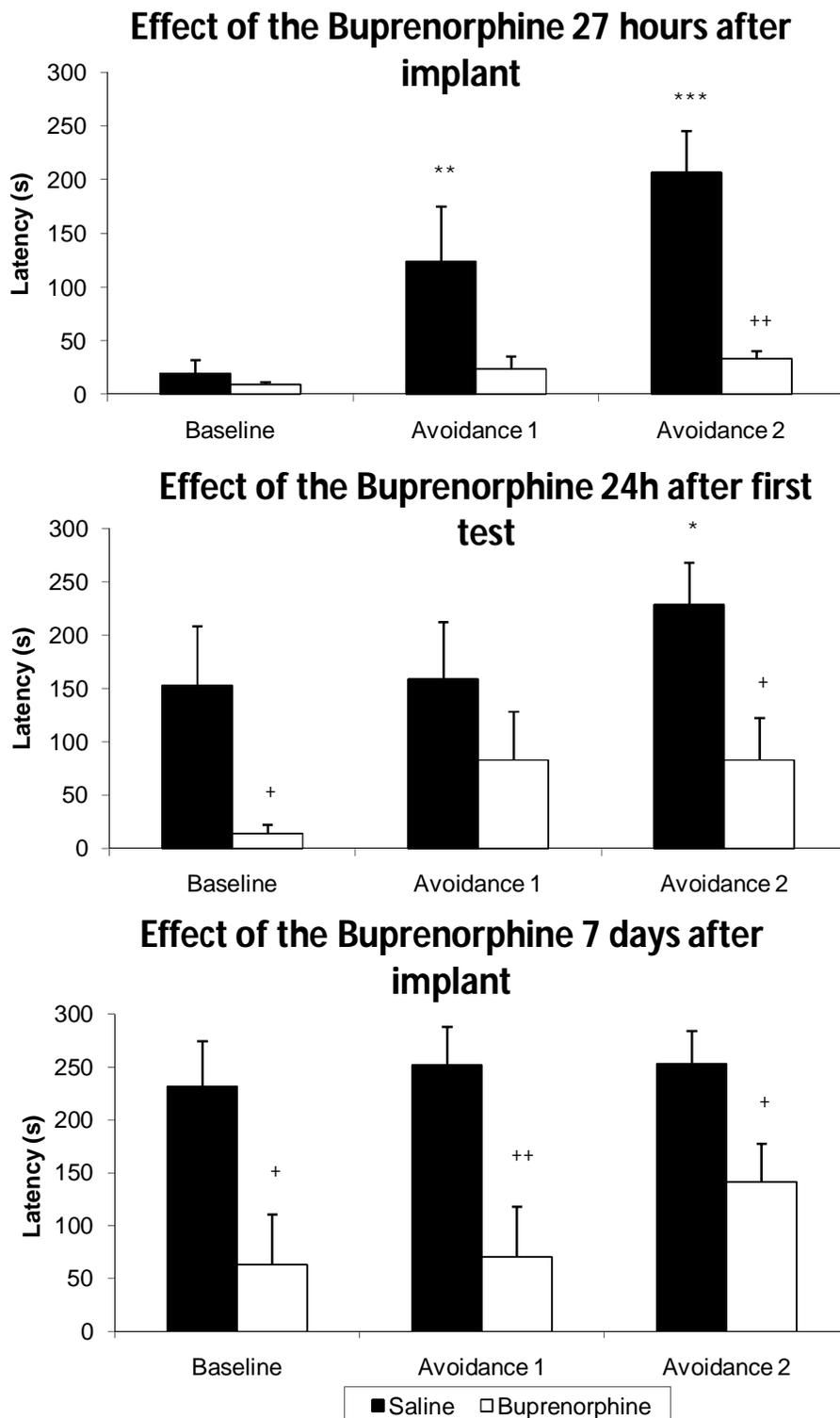


Figura 2. Média+EPM das latências em segundos das esquivas no LTE apresentadas por animais com implante de Buprenorfina e seus controles 27 horas após o implante dos adesivos, 24 horas após o primeiro teste e 7 dias após o implante. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam as diferenças em relação à linha de base no mesmo grupo e + $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam diferenças para com o grupo controle.

Não se constatou efeito dos implantes de Buprenorfina sobre as fugas nem no tratamento e nem nas repetições em nenhuma das situações estudadas (Figura 3). Na primeira exposição: não houve efeito do tratamento [$F_{(1,13)}=0,08$; $p=0,784$], como também não se constatou efeito das repetições [$F_{(2,26)}=0,94$; $p=0,402$] e nem interação entre os fatores [$F_{(2,26)}=0,90$; $p=0,419$]. Na segunda exposição ao LTE: não houve efeito do tratamento [$F_{(1,13)}=0,88$; $p=0,365$], como também não se constatou efeito das repetições [$F_{(2,26)}=0,34$; $p=0,715$] e nem interação entre os fatores [$F_{(2,26)}=1,17$; $p=0,326$]. Na terceira exposição ao LTE ocorreu o mesmo: não houve efeito do tratamento [$F_{(1,12)}=1,78$; $p=0,207$], como também não se constatou efeito das repetições [$F_{(2,24)}=1,92$; $p=0,168$] e nem interação entre os fatores [$F_{(2,24)}=0,46$; $p=0,634$].

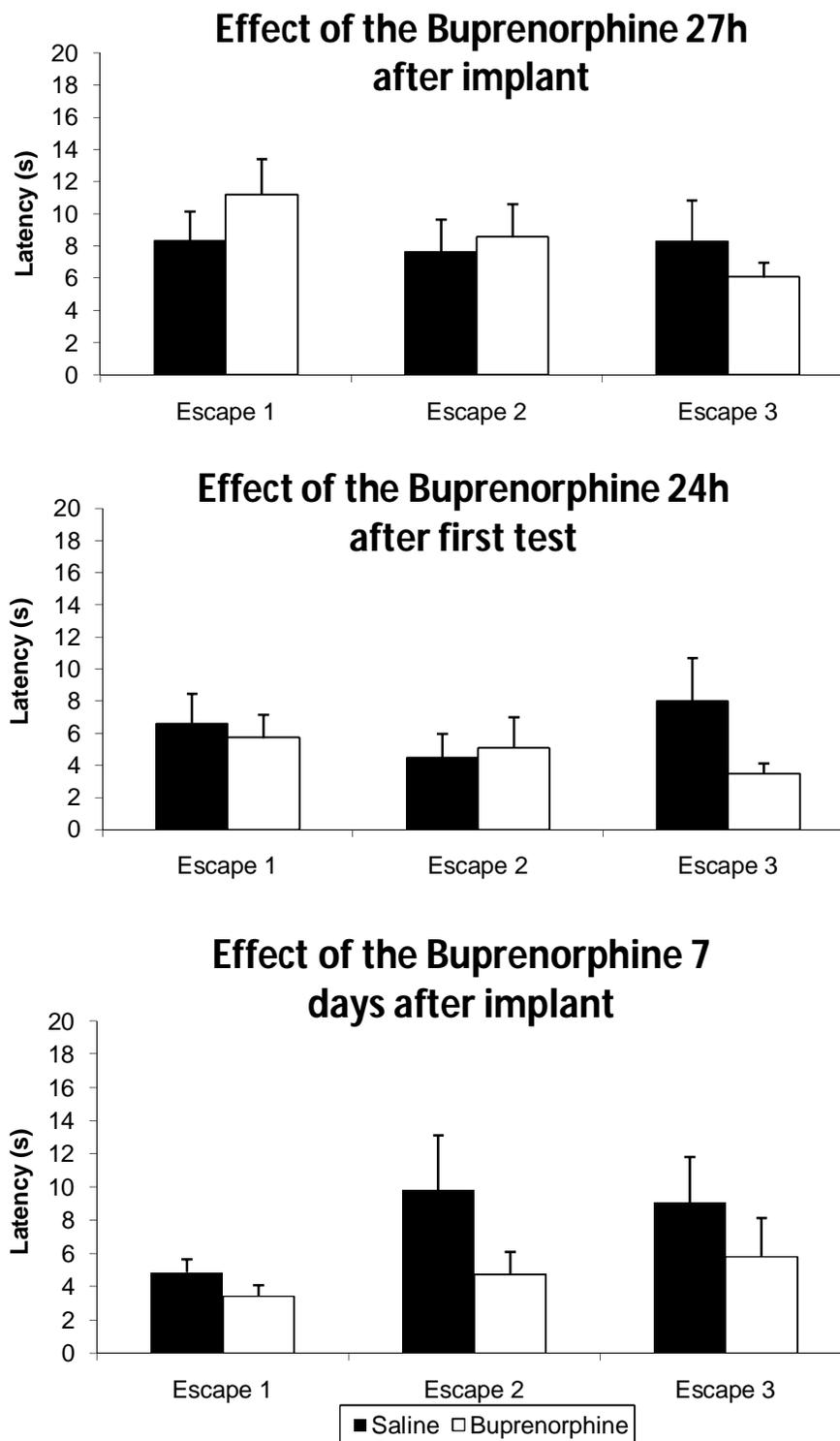


Figura 3. Média+EPM das latências em segundos das fugas no LTE apresentadas por animais com implante de Buprenorfina e seus controles, 27 horas após o implante dos adesivos, 24 horas após o primeiro teste e 7 dias após o implante.

Campo Aberto

Analisando o número de quadrados percorridos no Campo Aberto pelos animais com implante de Buprenorfina (Figura 4) a ANOVA mostrou que houve diferenças em relação ao controle nas 27 horas após o implante [$F_{(1,13)}=12,63;p=0,003$], como também 24 horas após o primeiro teste [$F_{(1,13)}=11,19;p=0,005$] e 7 dias após o implante [$F_{(1,12)}=13,61;p=0,003$]. O teste de Duncan apontou que houve aumento de atividade motora relacionado ao implante de Buprenorfina ($p<0,01$).

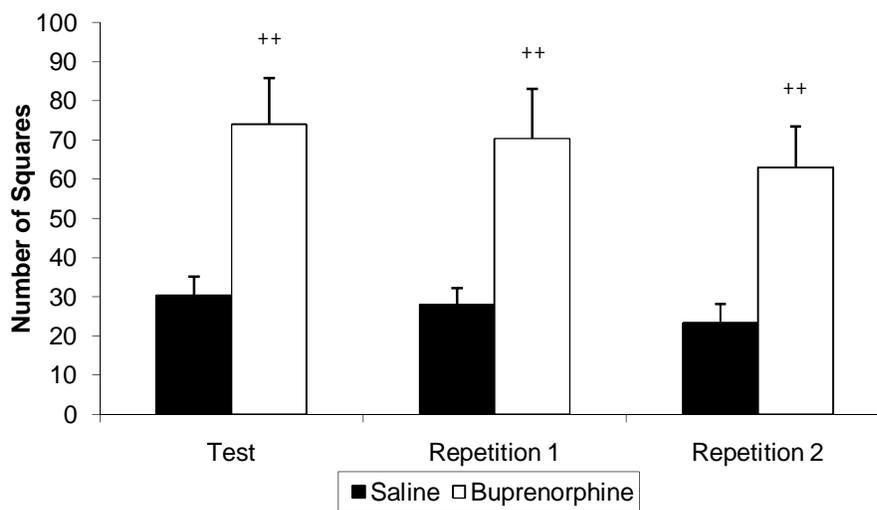


Figura 4. Média+EPM do número de quadrados percorridos no Campo Aberto por animais tratados com Buprenorfina através do implante dos adesivos e seus controles. ANOVA seguida de Duncan: ⁺⁺ $p<0,05$ representam as diferenças em relação aos controles nas três reexposições.

Teste de Transição Claro-Escuro

Analisando o tempo de latência para saída do lado claro no Teste de Transição Claro-Escuro foi possível perceber através da ANOVA de uma via que houve efeito do tratamento [$F_{(1,18)}=6,09; p=0,024$]. O teste de Duncan apontou que os animais tratados com Buprenorfina demoraram mais para sair do lado claro em direção ao lado escuro, quando comparados com os animais do grupo controle

($p < 0,05$). O mesmo se constatou na análise do tempo de permanência dos ratos no lado claro do aparato [$F_{(1,18)}=5,25; p=0,034$]. Ou seja, a Buprenorfina causou ansiólise, pois os animais experimentais permaneceram mais tempo no lado claro ($p < 0,05$). Não se constatou diferenças entre os grupos nas análises do comportamento de espreita [$F_{(1,18)}=0,81; p=0,380$], nas transições entre os lados [$F_{(1,18)}=0,11; p=0,742$] e nem na atividade motora [$F_{(1,18)}=0,07; p=0,781$]. Todos esses dados podem ser visualizados através da Figura 5.

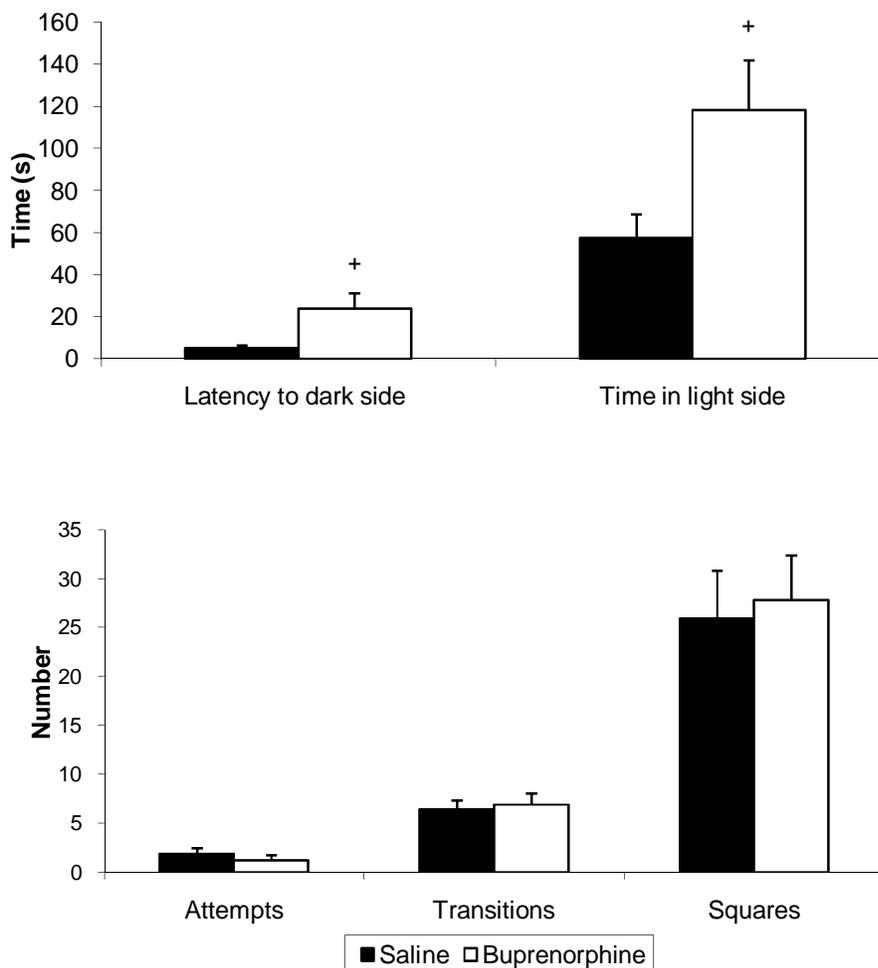


Figura 5. Média±EPM do tempo de latência de saída do lado claro e tempo de permanência no claro, bem como do número de espreitas, transições e quadrados percorridos apresentado por animais tratados com Buprenorfina através do implante dos adesivos e seus controles. ANOVA seguida pelo teste de Duncan: * $p < 0,05$ representam as diferenças para com o grupo controle.

Experimento 2 - Efeito agudo da Buprenorfina sistêmica

Teste de contorção

Na análise do efeito analgésico agudo da Buprenorfina administradas em diferentes doses por via IP (Figura 6), a ANOVA de uma via mostrou que as doses de 1,5 mg/kg, 3,0 mg/kg e 6,0 mg/kg aplicadas 10 minutos antes do teste diminuiram tanto a frequência das contorções [$F_{(3,16)}=4,33$; $p=0,020$], como também a duração das mesmas [$F_{(3,16)}=4,17$; $p=0,023$]. O tratamento com Buprenorfina também ocasionou diminuição no número de vezes [$F_{(3,16)}=4,17$; $p=0,023$] e no tempo [$F_{(3,16)}=10,87$; $p<0,001$] em que os animais permaneceram manifestando o comportamento de auto-limpeza. Em contrapartida a frequência [$F_{(3,16)}=1,65$; $p=0,217$] e a duração [$F_{(3,16)}=1,76$; $p=0,196$] dos levantamentos, assim como o número de quadrados percorridos pelos animais durante o teste não foram diferentes [$F_{(3,16)}=1,11$; $p=0,376$].

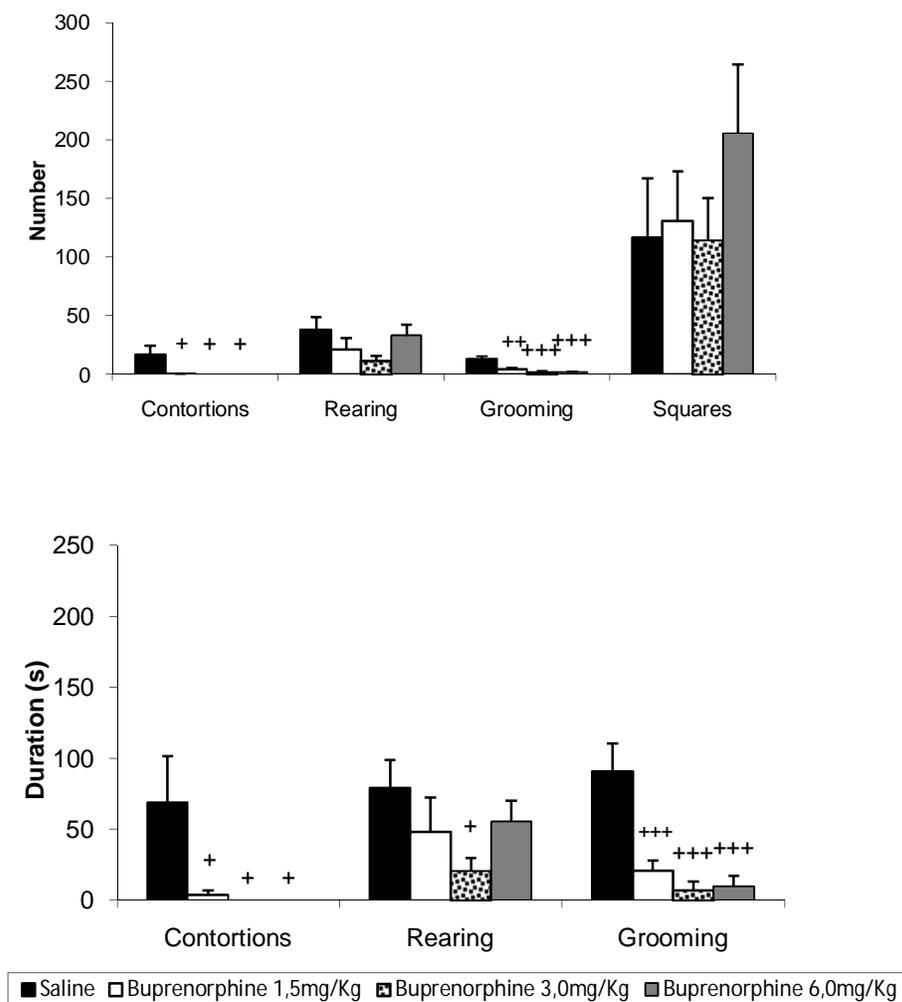


Figura 6. Média+EPM de frequência e duração de contorções, levantamentos, auto limpeza e quadrados percorridos por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e por animais do grupo controle e seus controles. ANOVA seguida pelo teste de Duncan: $^+p<0,05$; $+++p<0,001$ representam diferenças para com o grupo controle.

Labirinto em T elevado

Na análise do efeito da Buprenorfina administrada por via IP sobre as esquivas inibitórias no LTE (Figura 7), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito do tratamento [$F_{(3,33)}=1,59$; $p=0,211$], mas houve efeito das repetições [$F_{(2,66)}=12,68$; $p<0,001$] e interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(6,66)}=3,81$; $p=0,002$]. O teste de Duncan apontou que houve aprendizagem nos animais controles e nos animais tratados com a menor dose de Buprenorfina

($p < 0,05$). Em contrapartida, na reexposição 24 horas após o primeiro teste, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve efeito do tratamento [$F_{(3,31)}=33,37$; $p < 0,001$], houve efeito das repetições [$F_{(2,62)}=12,68$; $p < 0,001$], mas não se constatou interação entre o tratamento e as repetições [$F_{(6,62)}=0,62$; $p=0,716$]. O teste de Duncan mostrou que houve diferenças entre as esquivas caracterizando aprendizagem nos animais controles ($p < 0,05$), mas a Buprenorfina prejudicou esse processo, e também desinibiu o comportamento diminuindo as esquivas em todas as doses e condições ($p < 0,001$).

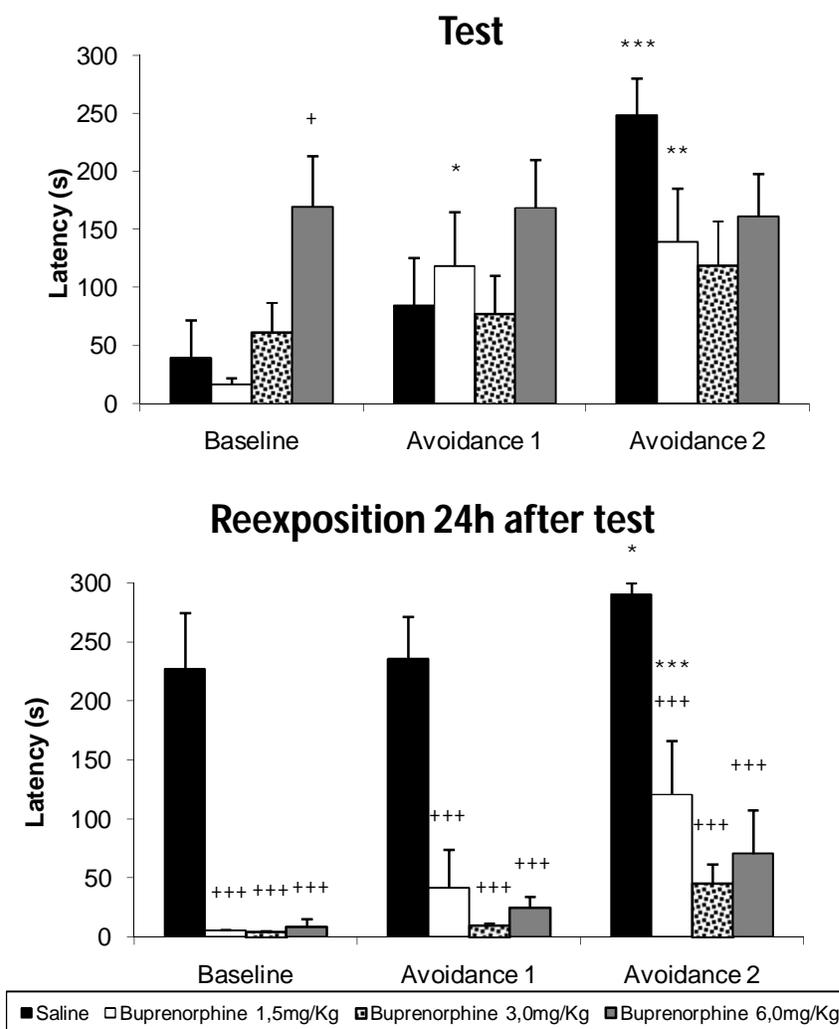


Figura 7. Média+EPM das latências em segundos das Esquivas no LTE apresentada por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e por animais do grupo controle, 10 minutos após a administração de Buprenorfina e 24 horas após o teste. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam as diferenças em relação a linha de base no mesmo grupo e * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ representam diferenças para com o grupo controle.

Quando se analisou as fugas (Figura 8) foi possível perceber que não houve efeito do tratamento [$F_{(3,33)}=0,98$; $p=0,411$], não houve efeito das repetições [$F_{(2,66)}=3,17$; $p=0,048$], não se constatou interação entre os fatores [$F_{(6,66)}=1,30$; $p=0,268$]. O teste de Duncan não apontou diferenças significativas para o estudo no que tange as diferentes fugas no mesmo tratamento e diferenças entre animais tratados com Buprenorfina e seus controles em cada fuga separadamente. O

mesmo quadro ocorreu na reexposição: não houve efeito do tratamento [$F_{(3,31)}=0,48$; $p=0,697$], nem variação entre os animais controles nas diferentes fugas [$F_{(2,62)}=0,56$; $p=0,576$], como também não se constatou interação entre os fatores [$F_{(2,62)}=1,20$; $p=0,316$].

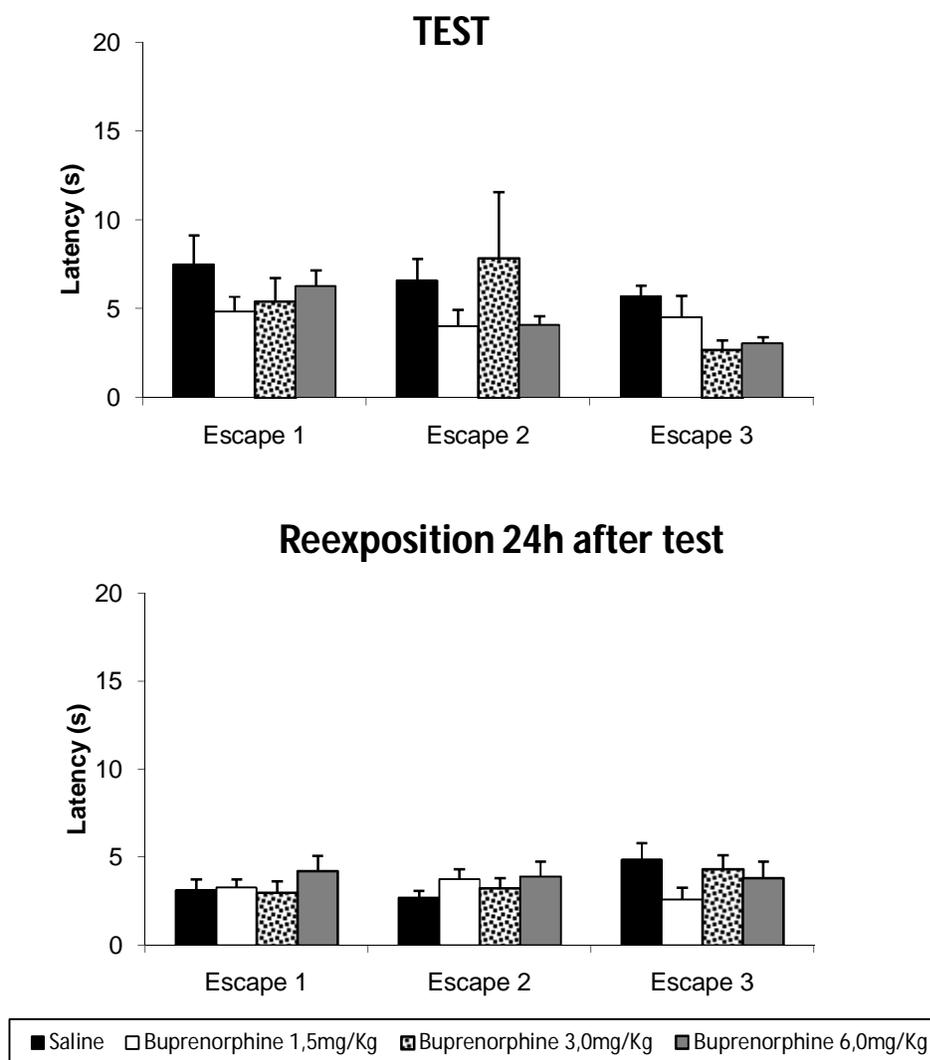


Figura 8. Média+EPM das latências em segundos das Fugas no LTE apresentada por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e por animais do grupo controle, 10 minutos após a administração de Buprenorfina e 24 horas após o teste.

Campo Aberto

Analisando o número de quadrados percorridos no Campo Aberto pelos animais tratados com Buprenorfina por via IP, a ANOVA mostrou que não houve efeito do tratamento [$F_{(3,33)}=2,19$; $p=0,108$]. Na reexposição houve efeito do tratamento, ou seja, os animais tratados com Buprenorfina nas três doses se deslocaram mais que os animais controles [$F_{(3,31)}=4,22$; $p=0,013$]. Esses dados podem ser visualizados através da Figura 9.

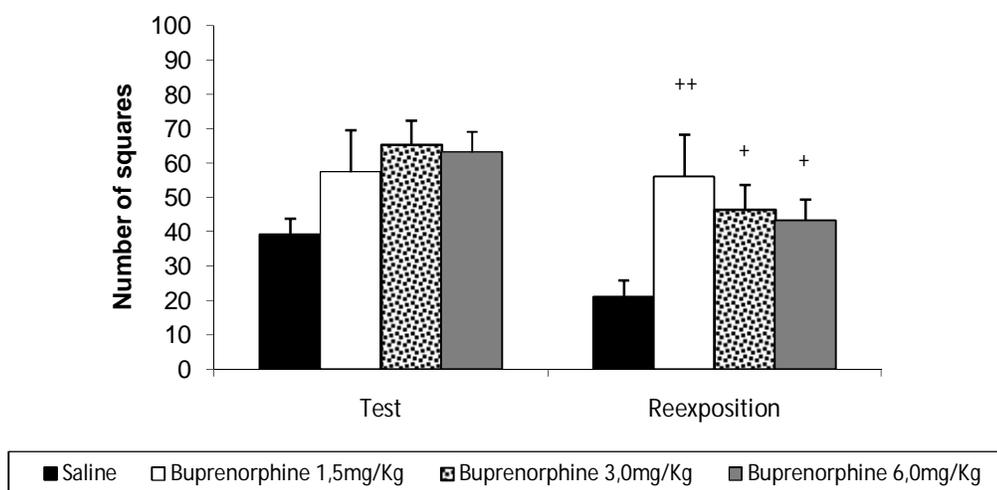


Figura 9. Média+EPM do número de quadrados percorridos no Campo Aberto apresentado por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e por animais do grupo controle, 10 minutos após a administração de Buprenorfina e 24 horas após o teste. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan * $p<0,05$; ** $p<0,01$ representam diferenças para com o grupo controle.

Teste de Transição Claro-Escuro

No Teste de Transição Claro-Escuro, analisando o tempo de latência para saída do lado claro verificou-se que não houve efeito do tratamento [$F_{(3,33)}=0,96$; $p=0,421$]. O mesmo ocorreu na análise do tempo de permanência no

compartimento claro: não houve efeito do tratamento [$F_{(3,33)}=0,59;p=0,624$]. Na reexposição não houve efeito do tratamento sobre a latência de saída do lado claro [$F_{(3,31)}=0,38; p=0,764$], como também não se constatou efeito do tratamento sobre o tempo de permanência no compartimento claro [$F_{(3,33)}=1,05; p=0,383$]. Esses dados podem ser visualizados através da Figura 10.

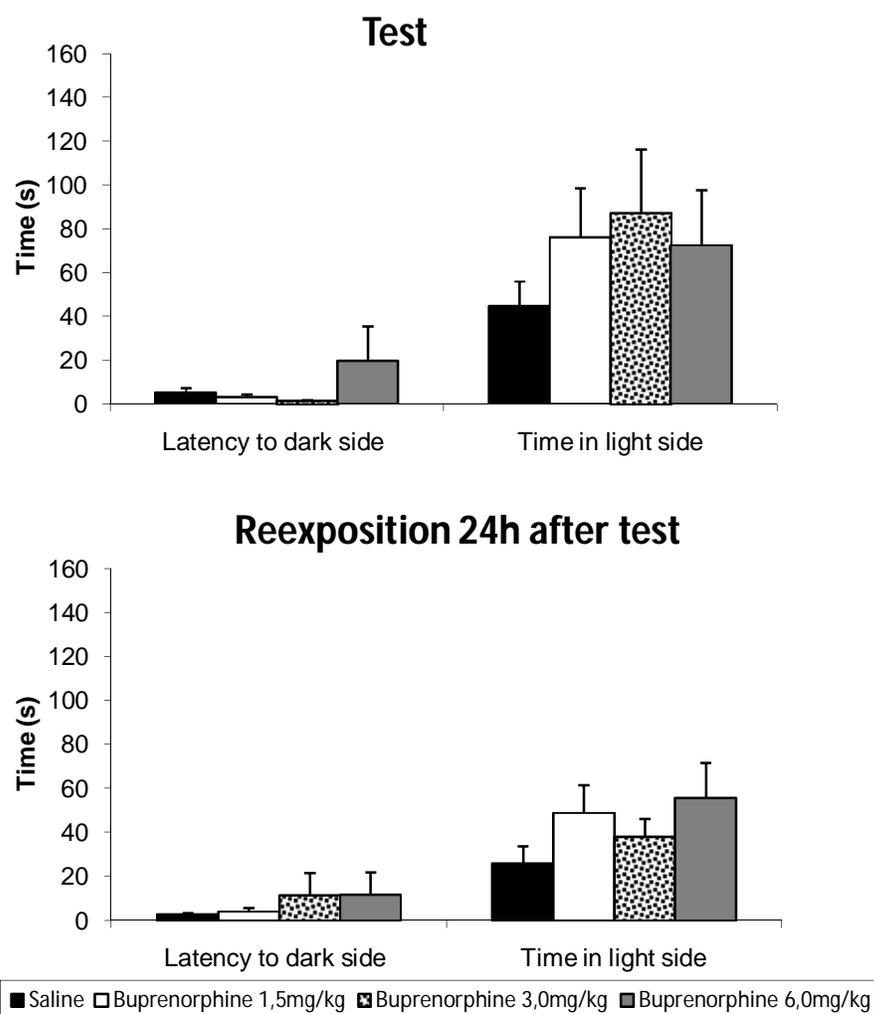


Figura 10. Média+EPM do tempo em segundos para saída do lado claro, como também de permanência no lado claro do aparelho apresentado por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e por animais do grupo controle, 10 minutos após a administração de Buprenorfina e 24 horas após o teste.

Quando se analisou os demais comportamentos (Figura 11) não se constatou efeito do tratamento sobre nenhum dos que foram analisados: espreita [$F_{(3,33)}=0,79;$

$p=0,510$]; transições [$F_{(3,33)}=1,26$; $p=0,304$]; quadrados percorridos [$F_{(3,33)}=0,98$; $p=0,413$]. O mesmo ocorreu na reexposição, não houve efeito do tratamento sobre os comportamentos: espreita [$F_{(3,31)}=0,76$; $p=0,524$]; transições [$F_{(3,31)}=2,76$; $p=0,058$]; quadrados percorridos [$F_{(3,31)}=2,76$; $p=0,059$].

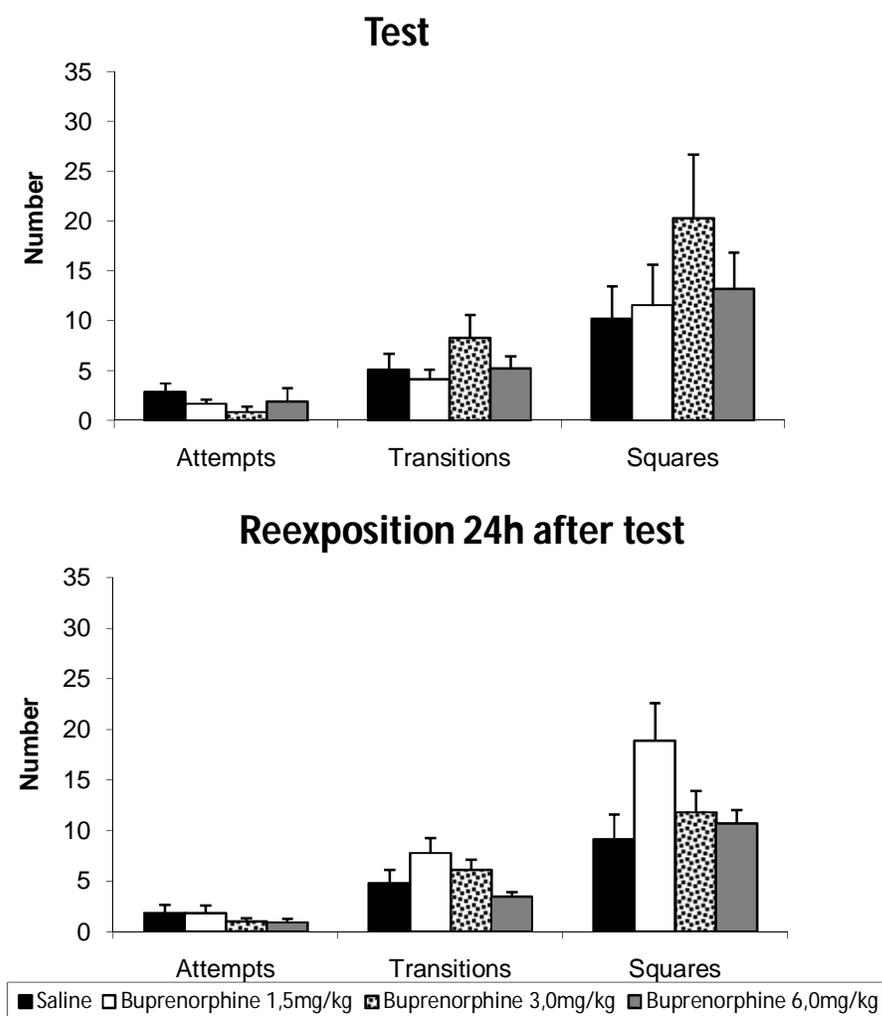


Figura 11. Média+EPM do número de espreitas, transições e quadrados percorridos no Teste de Transição Claro-Escuro, apresentado por animais tratados com Buprenorfina IP nas doses de 1,5 mg, 3,0 mg e 6,0 mg e por animais do grupo controle, 10 minutos após a administração de Buprenorfina e 24 horas após o teste.

Discussão

Os resultados obtidos no teste de contorção para avaliar a ação analgésica da Buprenorfina, tanto pela absorção através da via subcutânea como na administração IP, corroboram com resultados de outros estudos que já evidenciaram a eficácia analgésica desse fármaco (Feng et al., 2012; Karp et al, 2014; Likar, 2006; Lutz e Kieffer, 2013; Roy-Byrne et al., 2013; Virk et al., 2009; Yamamoto et al., 2006). Os resultados obtidos sugerem que uma dose sustentada, que foi possibilitada por meio do implante do adesivo de Buprenorfina, foi eficaz, e as doses agudas para analgesia, também mostraram efeito. Esta constatação está consoante com o estudo de Clark et al. (2014) que compararam níveis séricos de Buprenorfina IR (liberação imediata) e SR (liberação sustentada) em ratos por um período de até 48 horas. A confirmação do efeito analgésico também evidencia que a extração da droga do adesivo pelo método de liofilização foi capaz de fornecer doses eficazes, já que as injeções do extrato de Buprenorfina nas três doses causaram diminuição de número e duração das contorções. Esse resultado corrobora o que foi observado em outros trabalhos que demonstraram a eficácia analgésica da Buprenorfina em estudos com animais (Curtin et al., 2009; Lutfy et al., 2003), e em humanos (Khanna e Pillarisetti, 2015; Kumar et al., 2016).

Sequencialmente foram conduzidas as avaliações comportamentais em grupos independentes de animais. As análises no LTE mostraram que os animais controles nos dois experimentos apresentaram a aprendizagem esperada em relação à experiência nesse teste (Graeff, 2003), com aumento progressivo na latência das esquivas na Linha de Base (LB) para Esquiva 2 (E2) exceto na

reexposição sete dias após o implante, quando se observou um aumento em todas as esquivas, caracterizando aumento de ansiedade nos animais controles devido à reexposição. As fugas, não foram alteradas nos animais controles, nem pela reexposição ao LTE. Investigações realizadas em outros laboratórios confirmam tais aspectos (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), demonstrando o controle e adequação das condições experimentais na realização desse teste. No entanto, não se identificou trabalhos relatando o efeito de reexposições ao LTE, como o que se realizou nesta pesquisa, a não ser quando as avaliações comportamentais foram conduzidas no Labirinto em Cruz Elevado (Fernandes e File 1996; Galvis-Alonso et al., 2010; Roy et al., 2009). Ou seja, a reexposição ao teste aumenta as esquivas, sem interferir nas fugas, apontando que a experiência aversiva repetida pode ocasionar aumento de ansiedade generalizada, mas não interfere na manifestação do pânico.

O implante do adesivo de Buprenorfina no tecido subcutâneo causou diminuição das esquivas no LTE, sem alteração nas fugas. Houve confirmação do efeito ansiolítico no Teste de Transição Claro-Escuro. Entretanto, animais sob efeito da Buprenorfina apresentaram aumento de atividade motora, mesmo que somente no Campo Aberto, já que não se verificou aumento no número de transições e no número de quadrados percorridos no Teste de Transição Claro-Escuro. O prejuízo nas esquivas tem sido interpretado como uma manifestação de ansiólise (Graeff, 2003), como o que tem sido observado pela ação de fármacos utilizados na clínica, e também demonstrado no LTE, o clonazepam e diazepam (Pobbe et al., 2014), alprazolam (Sant'Ana et al., 2016), buspirona (Graeff et al.,1998; Poltronieri et al., 2003) e imipramina crônica (Teixeira et al., 2000).

A Buprenorfina quando liberada subcutaneamente, após o implante dos adesivos, prejudicou as esquivas, mas de forma diferente em relação aos diferentes momentos de avaliação comportamental, ou seja: na primeira avaliação diminuiu a esquiva na E2. Nas reexposições, 24 horas após o teste, afetou a LB e a E2 na mesma direção. Sete dias depois ainda se viu o efeito desse fármaco causando diminuição na manifestação desse comportamento inibitório nas três esquivas, mostrando de fato seu efeito desinibitório, já que os animais controles apresentaram aumento das três esquivas. Entretanto, em nenhum dos momentos verificou-se alteração nas fugas.

Na análise do efeito agudo da administração IP da Buprenorfina foi possível verificar que o efeito desinibitório sobre as esquivas apareceu somente 24 horas após a reexposição ao LTE. O mesmo ocorreu no trabalho de Falcon et al.(2015), fato esse que foi associado à cinética lenta de dissociação da Buprenorfina dos seus receptores (Yu et al., 2006). Mas esse efeito não foi identificado no Teste de Transição Claro-Escuro. Além disso, no mesmo período em que se verificou o quadro desinibitório houve aumento de atividade motora. No entanto esse aumento de atividade só foi identificado no Teste do Campo Aberto e não no Teste de Transição Claro-Escuro. Convém ressaltar nesse ponto de análise que na avaliação do efeito do implante da Buprenorfina o Teste de Transição Claro-Escuro foi realizado em animais independentes, ou seja, não foram previamente submetidos a outros testes, como o que ocorreu no segundo experimento.

Em síntese, a Buprenorfina, independentemente da forma de administração prejudicou as esquivas, sem afetar as fugas, denotando que esse fármaco, diminuiu a manifestação de comportamentos relacionados com a ansiedade generalizada, mas não afetou os comportamentos associados ao pânico. Tais resultados estão em

acordo com dados apresentados em outras pesquisas com outros modelos de ansiedade como por exemplo no Teste do Sobressalto Potencializado pelo Medo, onde Glover e Davis (2008), utilizando baixas doses de Buprenorfina constataram efeito ansiolítico. Falcon et al. (2015) através do Teste de Hipofagia Induzida por Novidade verificaram um efeito ansiolítico da Buprenorfina tanto 24 horas após o tratamento como também em decorrência do tratamento subcrônico. Em humanos, onde os níveis de cortisol salivar foram mensurados após o Teste de Falar em Público, notou-se uma diminuição em seus níveis, bem como uma diminuição da ansiedade relatada durante o teste após 90 minutos após tratamento com 0,2 ou 0,4 mg de Buprenorfina sublingual (Bershad et al., 2015).

No entanto, um aspecto precisa ser destacado. Na maioria das vezes que se identificou prejuízo nas esquivas houve aumento de atividade motora. Fica a questão: será que o aumento de atividade motora afetou o teste no LTE e o que se constatou não foi ansiólise? Nesse caso, se a atividade motora tivesse de fato afetado o teste, tanto as esquivas, como também as fugas seriam alteradas. Os animais fugiriam mais rapidamente do braço aberto onde foram colocados, o que seria esperado caso fosse de fato uma alteração do padrão motor.

Pesquisas prévias que avaliaram a atividade motora em animais tratados com a Buprenorfina demonstraram resultados paradoxais. Falcon et al. (2015) mostraram que a Buprenorfina aumentou a atividade motora dos animais 30 minutos após a administração, efeito este suprimido com a administração subcrônica por 6 dias. Já Almatroudi et al. (2016) não encontraram aumento de atividade motora em tratamentos com doses de 1mg/kg de Buprenorfina. Nesse trabalho os testes de atividade motora foram realizados 1 hora após as injeções intraperitoneais. Browne et al. (2015) avaliaram a atividade motora 24 horas após injeções subcutâneas de

0,25, 0,75 e 2,25 mg/kg de Buprenorfina em três diferentes linhagens de ratos, e não identificaram alteração da atividade motora.

Sabe-se que a Buprenorfina é um opioide sintético derivado da tebaína, alcaloide extraído da *Papaver somniferum*, popularmente conhecida como papoula. É agonista parcial μ , pois apresenta afinidade por esses receptores. No entanto, possui atividade intrínseca baixa. É antagonista κ e também apresenta afinidade por receptores δ . Efeitos ansiolíticos e antidepressivos são atribuídos ao antagonismo κ , e os efeitos analgésicos são mediados pela ativação dos receptores μ (Glover e Davis, 2008; Karp et al., 2014; Likar, 2006; Virk et al., 2009; Yamamoto et al., 2006).

Mais potente que a morfina – a dose de 0,4 mg tem equivalência analgésica a 10mg de morfina (Glover e Davis, 2008). O pico de concentração sanguínea para administração oral da Buprenorfina é de 1 a 2 horas, e para a administração intramuscular ou intravenosa é de 5 minutos. A meia-vida de dissociação desse opioide é de 166 minutos, o que sugere que seus níveis plasmáticos não acompanham as manifestações fisiológicas, sendo que a meia-vida plasmática é de aproximadamente 3 horas e isso não guarda relação com o desaparecimento dos efeitos. Seus metabólitos são excretados na urina e nas fezes. Ela é metabolizada pela CYP3A4 no fígado para norBuprenorfina, que pode exercer ação farmacológica de analgesia mínima (Likar, 2006). Produz sintomas mínimos de abstinência e estes, quando aparecem, são tardios, não são tão graves e desaparecem em 1 a 2 semanas (Brunton et al., 2012; Rang; Dale, 2004).

Virk et al. (2009) relatam que a Buprenorfina se dissocia de forma lenta dos receptores μ , a Buprenorfina tem curva dose-efeito em forma de sino, o que indica que as doses baixas têm efeito e isso se confirmou no trabalho de Glover e Davis (2008). Doses tetos, responsáveis por desencadear um efeito de depressão

respiratória, não precisam ser alcançadas. O fato de pequenas doses produzirem efeitos esperados confere segurança em relação aos efeitos indesejáveis, tornando-a mais segura. De acordo com Yu et al. (2006) a potência da Buprenorfina e a lenta dissociação dos receptores resultam em baixas doses terapêuticas em animais e humanos concomitantes com baixas concentrações plasmáticas. Virk et al. (2009) citam ainda que a Buprenorfina inibe a dessensibilização dos receptores opioides, o que impede a tolerância comum aos opioides, e o fato de ser um agonista parcial diminui seu potencial de desencadear disforia.

Outro aspecto, que não se constitui dúvida, mas sim uma constatação no estudo, é que os tratamentos com Buprenorfina não afetaram as fugas. Esperava-se que esse fármaco pudesse afetar este comportamento defensivo também, ampliando o tempo de permanência no espaço aberto, como o que se observou em estudos prévios com a morfina, um agonista opioide pleno (Roncon et al., 2013). Uma série de trabalhos tem mostrado que drogas clinicamente eficazes no tratamento desse transtorno, como o alprazolam e o clonazepam, inibem a resposta de fuga, enquanto que drogas capazes de induzir ataques de pânico em voluntários saudáveis, como agonistas de receptores de colecistocinina, têm efeito oposto (Moreira et al., 2013; Pobbe et al., 2014; Zanoveli et al., et al., 2005). Antidepressivos tricíclicos imipramina e a clomipramina, assim como os ISRSs, fluoxetina, sertralina e escitalopram também inibem a expressão da resposta de fuga, quando administrados cronicamente (21 dias), mas não agudamente (Teixeira et al., 2000; Poltronieri et al., 2003; Pinheiro et al., 2008; Zanoveli et al., 2007). O mesmo não acontece após a administração aguda ou crônica de drogas ansiolíticas, como o diazepam e a buspirona (Zangrossi e Graeff, 2014) que são destituídas de efeitos anti-pânico relevantes na clínica (Sheehan et al., 1990).

Pesquisas desenvolvidas nos últimos anos com o LTE sugerem que receptores serotoninérgicos presentes na SCPD medeiam o efeito panicolítico causado pelo tratamento crônico com drogas antidepressivas. A SCPD, localizada no mesencéfalo, é considerada uma estrutura crítica na fisiopatologia do TP (Schenberg et al., 2001; Graeff, 2012 para revisão). Por exemplo, a estimulação elétrica/química desta estrutura evoca respostas de fuga abruptas e vigorosas, semelhantes àsquelas produzidas durante um ataque predatório (Schenberg et al., 2001). Da mesma forma descrita acima com a fuga no LTE, esta resposta de fuga induzida pela estimulação da SCPD também é inibida pela administração crônica, mas não aguda, de drogas antidepressivas como a clomipramina e a fluoxetina (Schenberg et al., 2001; Vargas e Schenberg, 2001). Outras investigações têm demonstrado que o efeito anti-pânico destas diferentes classes de drogas envolve a facilitação da neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} na SCPD (De Bortoli et al., 2006, 2008; Zangrossie Graeff, 2014; Zanoveli et al., 2005, 2007, Zanoveli et al., 2010). Trabalhos mais recentes mostraram que a naloxona, um antagonista opioide, foi capaz de inibir a ação panicolítica da administração crônica da fluoxetina, um ISRS, indicando a interação entre atividade serotoninérgica e opioidérgica na modulação do pânico (Roncon et al., 2012).

Finalizando, os resultados constatados na presente investigação precisam ser compreendidos a partir do que se conhece sobre a ação dos opioides sobre os seus receptores. Efeitos sobre a ansiedade e atividade motora observados neste estudo não podem ser relacionados especificamente ao receptor κ ou ao μ , pois as regiões que modulam os comportamentos defensivos apresentam os três tipos de receptores μ κ δ (Colasanti et al., 2011; Feng et al., 2012; Lutz e Kieffer, 2013; Mansour et al., 1988), e o perfil farmacológico da Buprenorfina permite sua atuação,

tanto sobre receptores κ como sobre receptores μ . Com base no que foi descrito, é provável que o efeito ansiolítico observado seja devido ao antagonismo da Buprenorfina sobre receptores κ e o efeito motor, tenha sido causado pelo agonismo parcial exercido pela Buprenorfina sobre receptores μ .

Em conclusão, a Buprenorfina nas doses e vias estudadas causou efeito analgésico e desinibiu o comportamento de esquivas e o comportamento motor dos ratos, mas não afetou as fugas, o que indica seu envolvimento na modulação de comportamentos defensivos apenas relacionados com a manifestação da ansiedade generalizada e não do pânico.

Referências

Allen DI, Jhonson AE, Temprei A, et al. (1993) Serotonergic lesions decrease mu- and delta-opiate receptor binding in discrete areas of the hypothalamus and in the midbrain central gray. *Brain Res Rev* 625: 269-275.

Almatroudi A, Husbands SM, Bailey CP, et al. (2016) Combined administration of buprenorphine and naltrexone produces antidepressant-like effects in rat. *J Psychopharmacol* 29(7): 812-821.

Anseloni VC, Coimbra NC, Morato S, et al. (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, et al. (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci* 19: 378-383.

Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, et al. (2005) Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* 19(6): 567-596.

Berrocoso E, Mico JA (2009) Cooperative opioid and serotonergic mechanisms generate superior antidepressant-like effects in rat model of depression. *The Int J Neuropsychopharmacol* 12: 1-12.

Berrocoso E, Sanchez-Blazquez P, Garzon J, et al. (2009) Opiates as Antidepressants. *Curr Pharm Des* 15: 1612-1622.

Bershad AK, Jaffe JH, Childs E, et al. (2015) Opioid partial agonist Buprenorphine dampens response to psychosocial stress in humans. *Psychoneuroendocrinology* 52: 281-288.

Blier P, Montigny C (1990) Electrophysiological investigation of the adaptive response of the 5-HT system to the administration of 5-HT_{1A} receptor agonists. *J Cardiovasc Pharmacol* 15(7): 42-48.

Blier P, Montigny C (1995) Blier and de Montigny reply: Certain combinations of antidepressant drugs are beneficial. *Trends Pharmacol Sci* 16: 17-28.

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 [internet]. Diário Oficial da União, Brasília, DF; 15 maio 1998. [citado 12 set 2016]. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29PRT_SVS_344_1998_COMP.pdf/f7c0dfd5-b16a-4077-b32c-d421f431c6e7

Brawman-Mintzer O, Lydiard RB (1996) Psychopharmacology of anxiety disorders: treatment resistance. *Ann Drug Therapy* 3: 31-88.

Browne CA, Nest D, Lucki I (2015) Antidepressant-like Effects of Buprenorphine in Rats Are Strain Dependent. *Behav Brain Res*.278: 385-392.

Brunton LL, Charnier BA, Knollmann BC (2012) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman* (12a. ed.) Porto Alegre: Artmed.

Clark TS, Clark DD, Hoyt RF Jr (2014) Pharmacokinetic comparison of sustained-release and standard buprenorphine in rat. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 53(4): 387-391.

Coimbra NC, Brandão ML (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 NC, Eichenberger GCD, Gorchinski RT, 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 NC, Osaki MY, Eichenberger GCD, et al. (2000) Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Psychopharmacology* 152: 422-430.

Colasanti A, Rabiner EA, Lingford-Hughes A, et al. (2011) Opioids and anxiety. *Psychopharmacology* 25: 1415-1433.

Curtin LI, Grakowsky JA, Suarez M, et al. (2009) Evaluation of buprenorphine in a postoperative pain model in rats. *Comp Med* 59: 60-71.

Cussac D, Rauly-Lestienne I, Heusler P, et al. (2012) μ -Opioid and 5-HT_{1A} receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways. *Cell Signal*, 24(8): 1648-1657.

De Bortoli VC, Nogueira RL, 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. *Psychopharmacology (Berl)* 183(4): 422-428.

De Bortoli VC, Nogueira RL, 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. *Psychopharmacology (Berl)* 198(3): 341-349.

Dremencov E, Gur E, Lerer B, et al. (2003) Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biological Psychiatry* 27(5): 729-739.

Emrich HM, Vogt P, Herz A (1982) Possible antidepressive effects of opioids: action of buprenorphine. *Ann N Y Acad Sci* 398: 108-112.

Falcon E, Maier K, Robinson SA, et al. (2015) Effects of buprenorphine on behavioral tests for antidepressant and anxiolytic drugs in rat. *Psychopharmacology* 232: 907-915.

Feng Y, He X, Yang Y, et al. (2012) Current Research on Opioid Receptor Function. *Curr Drug Targets* 13(2): 230-246.

Fernandes C, File SE (1996) The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 31-40.

Galvis-Alonso OY, Garcia AMB, Orejarena MJ, et al. (2010) A combined study of behavior and Fos expression in limbic structures after re-testing Wistar rats in the elevated plus-maze. *Brain Res Bull* 81: 595-599.

Glover EM, 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. *Psychopharmacology* 198: 167-180.

Graeff FG (2003) Serotonina, matéria cinzenta periaqueductal e transtorno do pânico. *Rev Bras Psiquiatr* 25(Supl II): 42-45.

Graeff FG (2012) New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Braz J of Med Biol Res* 45(4): 366-375.

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

Graeff FG, Viana MB, 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.

Gray JA, McNaughton N (1996) 'The neuropsychology of anxiety: Reprise'. in DA Hope (Ed.), *Perspectives on Anxiety, Panic and Fear* (pp. 61-134). Nebraska: University of Nebraska Press.

Grunhaus L, Harel Y, Krugler T, et al. (1988) Major depressive disorder and panic disorder. Effects of comorbidity on treatment outcome with antidepressant medications. *Clin Neuropharmacol*, 11(5): 454-461.

Hjorth S, Bengtsson HJ, Kullberg A, et al. (2000) Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *J Psychopharmacol* 14(2): 177-185.

Hoffman EJ, Mathew SJ (2008) Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *MT Sinai J Med* 75: 247-262.

Khanna IK, Pillarisetti S (2015) Buprenorphine – an attractive opioid with underutilized potential in treatment of chronic pain. *J Pain Res* 8: 859-870.

Karp JF, Butters MA, Begley AE, et al. (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 mu-opioid and 5-HT_{1A} presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology* 41(5): 529-538.

Kumar S, Chaudhary AK, Singh PK, et al. (2016) Transdermal Buprenorphine Patches for Postoperative Pain Control in Abdominal Surgery. *J Clin Diag Res JCDR* 10(6):UC05-UC08.

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

Lutfy K, Eitan S, Bryant CD, et al. (2003) Buprenorphine-induced antinociception is mediated by μ -opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *J Neurosci*. 23:10331–10337.

Lutz PE, Kieffer BL (2013) Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci*. 36(3): 195-206.

Mansour A, Fox CA, Akil H, et al. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18(1): 22-29.

Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, et al. (1988) Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci* 11(7): 308-314.

McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61(3): 161-176,

Milligan ED, Zapata V, Chacur M, et al. (2004) Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci* 20: 2294-2302.

Moreira FA, Gobira PH, Viana TG, et al. (2013) Modeling panic disorder in rodents. *Cell and Tissue Res* 354: 119-125.

Morgan MM, Whitney PK, Gold MS (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 ML (1993) Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem and Behav* 44 (1): 119-125.

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

Nobre MJ, Ribeiro Dos Santos N, Aguiar MS, et al. (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 EB (2000) Etholog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput* 32(3): 446-449.

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

Pellow S, Chopin, PFSE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3): 149-167.

Pinheiro SN, Del-Bem CM, Zangrossi H, et al. (2008) Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *J Psychopharmacol* 22(2): 132-137.

Pobbe RL, Lopes MA, Vasconcelos AT, et al. (2014) Influence of procedural variables on rat inhibitory avoidance and escape behaviors generated by the elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 273: 45-51.

Poltronieri SC, 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.

Rang HP, Dale MM (2004) *Farmacologia* (5a. ed.). São Paulo: Guanabara Koogan.

Roncon CM, Biesdorf C, Santana RG, et al. (2012) The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *J Psychopharmacol (Oxford, England)* 26(4): 525-531

Roncon CM, Biesdorf C, Coimbra NC, et al. (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 (Oxford, England)* 27(12): 1141-1148.

Rosenblum A, Cruciani CA, Strain EC, et al. (2012) Sublingual Buprenorphine/Naloxone for Chronic Pain in At-Risk Patients: Development and Pilot Test of a Clinical Protocol. *J Opioid Manag* 8(6): 369-382.

Roy V, Chapillon P, Jeljeli M, et al. (2009) Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioural interpretations during test and retest. *Psychopharmacol* 203: 131-141.

Roy-Byrne P, Sullivan MD, Sherbourne CD, et al. (2013) Effects of pain and prescription opioid use on outcomes in a collaborative care intervention for anxiety. *Clin J Pain* 29(9): 800-806.

Sant'Ana AB, Weffort LF, SergioTO, et al. (2016) Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. *Behav Brain Res* 315: 115-122.

Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, et al. (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8): 647-659.

Sheehan DV, Raj AB, Sheehan KH, et al. (1990) Is buspirone effective for panic disorder? *J Clin Psychopharmacol* 10(1): 3-11.

Silva JS, Saraiva SRGL, Oliveira Jr RG, et al. (2013) Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev Bras Farm* 94(1): 18-23.

Tao R, Auerbach SB (2002) Opioid Receptor Subtypes Differentially Modulate Serotonin Efflux in the Rat Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 303(2): 549-556.

Teixeira RC, Zangrossi Jr. H, Graeff FG (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 VJ, Ghosh R (2008) Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Curr Drug Targets* 9(10): 887-894.

Tian X, Chen J, Xiong W, et al. (2009) Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in rat. *Peptides* 30(7): 1348-1354.

Vargas LC, Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 155(3): 260-268.

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

Virk MS, Arttamangkul S, Birdsong WT, et al. (2009) Buprenorphine is a weak partial agonist that inhibits opioid receptor desensitization. *J Neurosci* 29(22): 7341-7348.

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

Whittle BA (1964) Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in rat. *Inter J Neuropharmacol* 3: 369-378.

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.

Yu S, Zhang X, Sun Y (2006) Pharmacokinetics of buprenorphine after intravenous administration in the mouse. *J Am Assoc Lab Anim Sc.* 45(3): 12-16.

Zangrossi H Jr., Graeff FG (2014) Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 46(3): 397-406.

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

Zanoveli JM, Nogueira RI, Zangrossi H (2005) Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol* 16(7): 543-552.

Zanoveli JM, Nogueira RI, 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. *Neuropharmacology* 52(4): 1188-1195.

Zanoveli JM, Pobbe RI, De Bortoli VC, et al. (2010) Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *Inter J Neuropsychopharmacol* 13(8): 1079-1088.

Zohar J, Westenberg HGM (2000) Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiat Scand* 101(403): 39-49.

ANEXO 1 - Normas da Revista *Journal of Psychopharmacology*

2015 Impact Factor: 3.637

Article types

Journal of Psychopharmacology is a peer-reviewed journal which welcomes the following article types for publication:

Original Papers: Research Reports, describing new experimental findings; both full papers and short reports requiring rapid dissemination.

Submitting your manuscript

How to submit your manuscript

The *Journal of Psychopharmacology* is hosted on SAGE Track, a web based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Visit <http://mc.manuscriptcentral.com/jop> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne [Online Help](#)

5.2 Title, keywords and abstracts

Please supply a title, short title, an abstract and keywords to accompany your article. The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting the SAGE Journal Author Gateway for guidelines on [How to Help Readers Find Your Article Online](#)

5.3 Corresponding author contact details

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers on the cover page. Academic affiliations are required for all co-authors. These details should be presented separately to the main text of the article to facilitate anonymous peer review, if you prefer.

ANEXO 2 - 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 n° 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

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA