



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

NATHÁLIA CRISTINA LIMA EVANGELISTA

**EFEITO DA POLIAMINA NO MODELO DE LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Renata Mortari

BRASÍLIA
novembro/2019



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

NATHÁLIA CRISTINAH LIMA EVANGELISTA

**EFEITO DA POLIAMINA NO MODELO DE LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto
Maior

Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Renata
Mortari

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Farmácia.

BRASÍLIA
novembro/2019

SUMÁRIO

1. Introdução -----	8
1.1. Aspectos gerais da ansiedade -----	8
1.2. Principais transtornos -----	9
1.3. Vias neurais da ansiedade -----	11
1.4. Modelos animais de ansiedade -----	12
1.5. Farmacoterapia da ansiedade -----	14
1.5.1. Diazepam -----	15
1.5.2. Pentilenotetrazol -----	17
1.5.3. Dizocilpina (MK-801) -----	17
1.5.4. Poliamina -----	18
2. Objetivo -----	21
2.1. Objetivo geral -----	21
2.2. Objetivos específicos -----	21
3. Materiais e Métodos -----	22
3.1. Sujeitos -----	22
3.2. Cirurgia -----	23
3.3. Labirinto em cruz elevada -----	24
3.4. Campo aberto -----	24
3.5. Verificação da posição da cânula-guia -----	26
3.6. Análise estatística -----	26
4. Resultados -----	27
4.1. Avaliação do efeito da poliamina no teste de labirinto em cruz elevado ----	27
4.2. Avaliação da alteração dos comportamentos espontâneos -----	28
5. Discussão -----	31

6. Conclusão -----	35
7. Referências Bibliográficas -----	36
8. Anexos: Declarações da CEUA -----	43

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre apoiou meus sonhos e se esforçam ao máximo para que eu lute pelos meus objetivos. Sou grata especialmente à minha mãe, sempre presente nos meus melhores e piores momentos.

Ao professor Rafael Maior, pela orientação não apenas na realização deste trabalho, mas também ao longo das reuniões realizadas no laboratório nesses quase dois anos. Sou grata à sua amizade e paciência para lidar comigo, e por ter sempre as respostas para as minhas dúvidas.

À professora Márcia Mortari, pelo acolhimento e material cedido para execução deste trabalho. Agradeço também aos seus alunos, Henrique e Ísis, pelo tempo dedicado a me ensinar as análises.

Aos meus amigos do curso de Farmácia: Alessandro, Amanda, Andressa, Juan, e Thamires, pelo apoio emocional durante toda a minha graduação até o momento atual, por compartilharem histórias, medos, alegrias e tristezas. Vocês foram minha maior motivação para conseguir passar mais de doze horas por dia nessa universidade até nas situações mais difíceis. Sou eternamente grata.

À minha veterana favorita, Sarah Steffany, por ter me ajudado desde o primeiro dia de matrícula e por continuar me orientando da melhor forma possível a caminho do tão almejado diploma.

Às minhas amigas de Belo Horizonte que, apesar da distância física, estão presentes quando preciso e sempre me deram o suporte necessário para continuar focada nos meus objetivos. Letícia, obrigada por ter lido todos os meus projetos e revisado cada trecho detalhadamente, mesmo não entendendo nada do assunto.

Às amigas que fiz no laboratório, que sempre deixam nossas reuniões mais leves e divertidas. Pedro e Fernando, por terem me proporcionando a oportunidade de trabalhar

com vocês nos experimentos da FAL. Luana, que se tornou minha dupla dinâmica e de armário, e que sempre tem um sorriso brilhante para acolher a todos nós. Lorena e Mariana, por terem estudado (e se estressado) junto comigo para tentar iniciar um experimento. Agradeço especialmente à Mariana, pelo tempo dedicado a revisar junto comigo esse trabalho completo.

Aos alunos da disciplina de Farmacologia de Princípios Ativos (Turma 1/2017), que executaram os experimentos: Adolfo Carlos, Ana Luísa, Ana Carolina, Gabriel Avohay, Lorena Rocha, Letícia Alves, Luís Felipe, Mariah Rocha, e os demais alunos.

Aos camundongos e aranhas utilizados, que tornaram possível a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT — antidepressivo tricíclico

AMPA — alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

CA — campo aberto

CETC — córtico-estriado-talâmico-cortical

CEUA — Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA — Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPFm — córtex pré-frontal medial

DPOC — doença pulmonar obstrutiva crônica

GABA — ácido gama-aminobutírico

IB — Instituto de Ciências Biológicas

i.c.v. — intracérebroventricular

i.p. — intraperitoneal

IRSN — inibidor da recaptação de serotonina e norepinefrina

ISRS — inibidor seletivo da recaptação de serotonina

LCE — labirinto em cruz elevada

NMDA — N-metil-D-aspartato

OMS — Organização Mundial de Saúde

PTZ — pentilenotetrazol

s.c. — subcutâneo

SNC — sistema nervoso central

TAG — transtorno de ansiedade generalizada

TEPT — transtorno de estresse pós-traumático

TOC — transtorno obsessivo-compulsivo

UnB — Universidade de Brasília

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da ansiedade

O medo/ansiedade é uma emoção primária, que resulta em uma série de comportamentos em resposta a possíveis ameaças, aumentando as chances de sobrevivência (GELFUSO et al., 2013; SARTORI et al., 2011). Quando ocorre de forma ocasional, trata-se de um aspecto emocional normal, caracterizada por respostas cognitivas e fisiológicas, tais como sudorese, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (CALHOON et al., 2015; SARTORI et al., 2011). No entanto, em alguns indivíduos, essa reação pode se tornar persistente, excessiva e/ou inapropriada, ocasionando um estado emocional debilitante e patológico (CALHOON et al., 2015; GELFUSO et al., 2013; SARTORI et al., 2011).

Entre todas as doenças mentais, os transtornos de ansiedade são as mais prevalentes (ZHONG et al., 2019). Acometem principalmente a população feminina, em uma faixa de 7,7% de casos na região das Américas. Além disso, cerca de 50% dos pacientes com depressão também são diagnosticados com ansiedade (MOLLER et al., 2015; WHO, 2017; ZHONG et al., 2019).

Dados da OMS indicam que, em 2015, a estimativa global da população com transtornos de ansiedade era de 3,6%, com um número total aproximado de 264 milhões de pacientes afetados (Figura 1). Na Europa e nos EUA, a ansiedade representa o maior problema de saúde em termos de custo, absenteísmo, deficiências e mortalidade prematura (GELFUSO et al., 2013; WHO, 2017). Foi registrada uma despesa em saúde de 41 bilhões de euros na União Europeia, variando de €500 para €1600 por caso no ano de 2004, de acordo com uma pesquisa na Alemanha (GELFUSO et al., 2013; MOLLER et al., 2015).

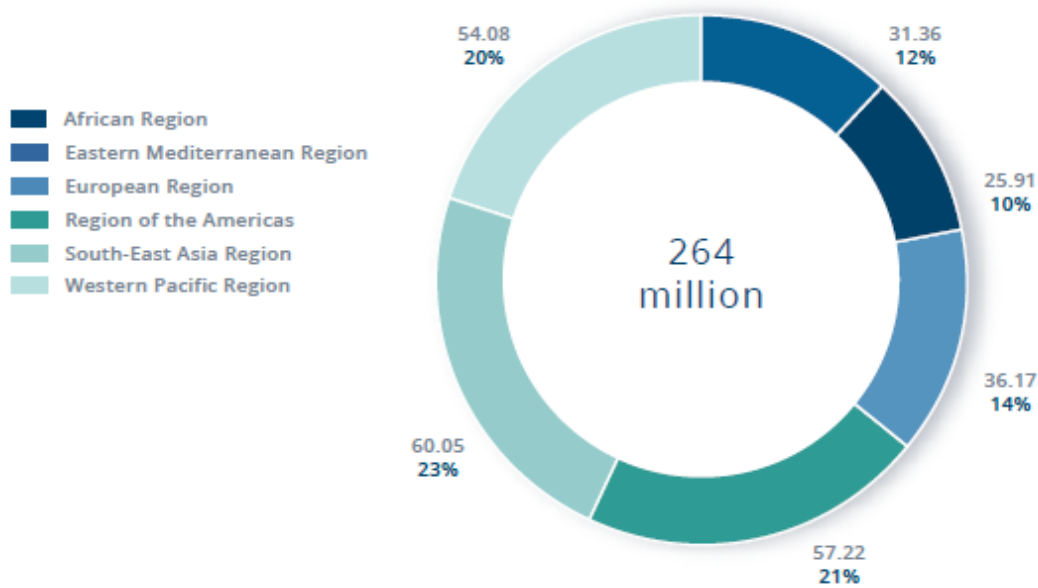


Figura 1 – Casos de transtorno de ansiedade (milhões) por região (WHO, 2017).

1.2. Principais transtornos

As principais categorias que envolvem a patologia são: transtorno de ansiedade generalizado (TAG), transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), fobia social, fobias específicas, agorafobia e transtorno de pânico (GELFUSO et al., 2013). No entanto, na última edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, o DSM-5, TOC e TEPT foram segregados em seções distintas dos demais transtornos de ansiedade (APA, 2014; BLACK et al., 2018).

O TAG é caracterizado por ansiedade difusa e preocupações excessivas que são difíceis de controlar (SHIN et al., 2010). Os pacientes podem experimentar sintomas somáticos de ansiedade, como tremor, palpitações, tontura, náusea e tensão muscular (BANDELOW et al., 2017). Apresentam, ainda, sintomas físicos de inquietação, fadiga, irritabilidade, dificuldade de concentração e insônia (BANDELOW et al., 2017; SHIN et al., 2010).

Indivíduos expostos a eventos que envolvem ameaça de morte ou lesões sérias, assim como reações de intenso medo ou desamparo, podem desenvolver TEPT (APA, 2014). Estes reexperimentam o evento traumático em forma de pesadelos, recordações intrusivas e *flashbacks*, apresentando sintomas de hiperexcitabilidade, hipervigilância, sobressalto exagerado, dificuldade de concentração e insônia (SHIN et al., 2010).

Pacientes com TOC relatam a presença de pensamentos ou imagens recorrentes e indesejáveis, descritas como obsessões, que causam angústia. Diante disso, comportamentos ritualísticos excessivos ou ações mentais, ambos de caráter compulsivo, são realizados em resposta às obsessões (GILLAN et al., 2017). O TOC é um transtorno cerebral crônico, constante e incapacitante, cujos tratamentos atualmente disponíveis são pouco efetivos (SHIN et al., 2010).

A fobia social (ou transtorno de ansiedade social) é caracterizada por um medo marcante e persistente de situações sociais, nas quais o indivíduo é o centro das atenções (BLACK et al., 2018). É caracterizada por preocupação excessiva com a possibilidade de escrutínio pelas outras pessoas, podendo resultar em evitação de situações sociais, além de prejuízo social, ocupacional e no rendimento acadêmico (BANDELOW et al., 2017; SHIN et al., 2010).

A fobia específica é restrita a situações circunstanciais, frequentemente associada ao medo excessivo, irracional e persistente de objetos ou eventos, como pequenos animais ou fenômenos naturais — lugares fechados, altura, sangue (BANDELOW et al., 2017). O medo e a evitação causam significativa angústia e/ou prejuízo no rendimento ocupacional, acadêmico ou social dos indivíduos (SHIN et al., 2010).

Ataques de pânico ocorrem na ausência de perigo real e resultam na excitabilidade do sistema nervoso simpático, gerando alterações respiratórias, cardiovasculares, gastrointestinais, autonômicas e cognitivas (BLACK et al., 2018; STRAWN et al., 2015).

O transtorno de pânico é caracterizado por intenso medo recorrente e inexplicado que ocorre de forma aguda, acompanhado de uma preocupação constante em sofrer futuros ataques de pânico ou vivenciar os sintomas por eles causados (APA, 2014).

Diferente do transtorno de pânico, a agorafobia envolve um medo ou ansiedade marcantes, em relação ao receio de ficar sozinho ou impossibilidade de fuga, caso um ataque de pânico ocorra (BLACK et al., 2018; GELFUSO et al., 2013). Os pacientes evitam ficar sozinhos fora ou até mesmo dentro de casa, evitam multidões e lugares fechados, e raramente entram em transportes públicos (BANDELOW et al., 2017).

1.3. Vias neurais

Alterações nas regiões da amígdala, cíngulo anterior e córtex insular foram identificadas em estudos funcionais e estruturais de imagem cerebral em pacientes com ansiedade e distúrbios relacionados, com destaque importante para o circuito córtico-estriado-talâmico-cortical na regulação emocional dos sintomas obsessivo-compulsivos, na experiência de nojo e ansiedade (BROOKS et al., 2015). Em estudos com animais e humanos, a amígdala foi considerada uma região central relacionada ao medo aprendido, responsável por responder a estímulos associados com o aumento da excitação e vigilância, a partir de informações recebidas pelo tálamo, regiões corticais, hipocampo e córtex pré-frontal (KIRLIC et al., 2017). No entanto, a amígdala sozinha não é responsável pelo processamento do medo, mas gera sinais que modulam circuitos diretamente ligados à geração da experiência dessa emoção (LEDOUX et al., 2016).

Alterações induzidas pelos estímulos do medo condicionado não se limitam apenas à amígdala, mas também têm sido identificadas nas regiões do tálamo, córtex auditivo, córtex pré-frontal medial (CPFm) e hipocampo (TOVOTE et al., 2015). O hipocampo é considerado uma região cerebral importante na consolidação da memória e

aprendizagem do medo, além do seu papel na navegação espacial, que contribui para as funções exploratórias e de conflito (KIRLICH et al., 2017). Contudo, a interação do hipocampo com a amígdala na regulação do condicionamento e modulação do medo ainda não foi bem esclarecida (TOVOTE et al., 2015).

O CPFm possui papel fundamental na modulação descendente da atividade da amígdala nas respostas de medo e ansiedade (KIRLICH et al., 2017). Áreas corticais mediais regulam negativamente a amígdala em humanos saudáveis, ao passo que este controle inibitório é prejudicado em pessoas com transtornos de ansiedade (TOVOTE et al., 2015).

A consequente ativação excessiva da amígdala foi identificada em indivíduos com TEPT, transtorno de pânico e na fobia social. Nesta última, estudos de neuroimagem de fobia social demonstraram hiperatividade da amígdala e do sistema límbico, também associada a esse déficit regulatório (BROOKS et al., 2015).

1.4. Modelos animais de ansiedade

Muitos dos sinais e sintomas de distúrbios psiquiátricos podem ser reproduzidos em modelos animais com o intuito de investigar teorias etiológicas específicas, fisiopatologias e conduzir estudos pré-clínicos (SZECHTMAN et al., 2017). Modelos animais têm fornecido informações válidas sobre o circuito neural, bem conservado em espécies de mamíferos, e processos cognitivo-afetivos relevantes para ansiedade e transtornos relacionados (BROOKS et al., 2015).

Os mamíferos Euarcontoglires (que incluem roedores e primatas) compartilham diversas características fisiológicas, viabilizando o uso destes animais para estudos translacionais para humanos (GRAHAM et al., 2011). Por exemplo, 70-90% dos genes de ratos e camundongos se assemelham aos de humanos, além de possuírem diversos

elementos comuns do SNC, como estruturas cerebrais dorsais e ventrais, envolvidas na criação e modulação comportamental (STEVENS et al., 2015).

Harro (2018) reuniu em um artigo de revisão os diversos tipos de testes para mensurar a ansiedade, sendo os mais utilizados: teste de campo aberto, compartimento claro/escuro, labirinto em cruz elevado, resposta emocional condicionada, sobressalto potencializado pelo medo e testes provocadores de estresse. Todos esses procedimentos laboratoriais com roedores mostram-se eficazes em medir os comportamentos semelhantes aos observados em humanos ansiosos, destacando o potencial de translação dos vários estudos já realizados (GRAHAM et al., 2011; HARRO, 2018).

O labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido utilizado para investigação de diversos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de agentes farmacológicos, drogas de abuso e hormônios (WALF et al., 2007). Trata-se de um dos modelos etológicos de ansiedade mais utilizados, podendo servir também como ferramenta para avaliação da interação entre memória e ansiedade em ratos (GODINHO et al., 2009). São colocados em conflito o impulso inato do animal em explorar novos ambientes e o medo de possíveis ameaças desconhecidas, que ocorre em um aparelho em forma de cruz, com dois braços abertos e dois fechados. Registra-se o tempo gasto nos braços abertos e a frequência de entrada nos mesmos (KIRLIC et al., 2017).

O teste de campo aberto (CA) é utilizado na avaliação de comportamentos ansiosos em testes com roedores, além de estar relacionado com o aumento da atividade e exploração dos animais nos ensaios seguidos pelo LCE (WALF et al., 2007). Também tem sido validado como importante ferramenta nos ensaios para avaliação de comportamentos espontâneos (CORREIA et al., 2017). O aparato de CA consiste em uma arena, com a superfície dividida em quadrantes iguais, em que os animais são colocados

no centro do campo e seus comportamentos são gravados por um período específico de tempo e posteriormente analisados (KIRLICH et al., 2017).

1.5. Farmacoterapia da ansiedade

Muitos dos transtornos de ansiedade são acessíveis à farmacoterapia (BANDELOW et al., 2017). Inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), inibidores de recaptção de serotonina-norepinefrina (IRSN), antidepressivos tricíclicos (ADT), benzodiazepínicos e antagonistas beta-adrenérgicos são as principais escolhas para o tratamento primário da ansiedade (BRUNTON et al., 2017; KATZUNG et al., 2017).

Como primeira escolha no tratamento de distúrbios crônicos da ansiedade, os ISRS e IRSN são as classes mais utilizadas, por possuírem uma relação positiva de risco/benefício em comparação aos outros fármacos (BANDELOW et al., 2017; KATZUNG et al., 2017). No entanto, apresentam início de ação lento (de 2 a 4 semanas, podendo chegar até a 6 semanas) e podem causar fortes efeitos adversos nas primeiras 2 semanas de tratamento, além de consideráveis taxas de recaídas (BRUNTON et al., 2017; SARTORI et al., 2011).

Classificados como segunda geração em questão de efetividade no tratamento da ansiedade, os ADT apresentam, em geral, maior frequência de eventos adversos, uma vez que atuam como antagonistas de receptores muscarínicos, serotoninérgicos e alfa-adrenérgicos (BYSTRITSKY et al., 2013). Desta forma, são escolhidos como opção farmacoterapêutica apenas após a tentativa de uso de ISRS e IRSN. Os ADT também devem ser utilizados com cautela em casos de pacientes com ideações suicidas, pois apresentam potencial letalidade após overdose (BYSTRITSKY et al., 2013; GELFUSO et al., 2013).

Diversas dessas classes farmacológicas foram desenvolvidas a partir da compreensão fisiopatológica da doença (GELFUSO et al., 2013). O modelo mais antigo de farmacoterapia da ansiedade era baseado no efeito de sedação dos medicamentos, sendo o sistema GABA o principal foco da descoberta de substâncias ansiolíticas (MURROUGH et al., 2015). Alguns benzodiazepínicos, como o diazepam, possuem rápido início de ação e meia-vida longa, atuando como moduladores alostéricos dos receptores GABA_A (GELFUSO et al., 2013; MURROUGH et al., 2015).

Apesar da segurança e eficácia dos benzodiazepínicos, o tratamento pode estar associado com depressão do SNC, resultando em fadiga, tontura, amnésia, tempo de reação aumentado, diminuição da atividade psicomotora, prejuízo nas funções cognitivas, dentre outros efeitos adversos (KATZUNG et al., 2017; MURROUGH et al., 2015). Além disso, possuem potencial risco de uso abusivo e dependência quando usados por longos períodos (MURROUGH et al., 2015). Em detrimento a esses múltiplos aspectos, diversas diretrizes clínicas não recomendam os benzodiazepínicos como primeira linha de tratamento (GELFUSO et al., 2013).

Os antagonistas beta-adrenérgicos surgem como uma alternativa para o controle de sintomas somáticos da ansiedade, induzidos pela ativação do sistema simpático (BRUNTON et al., 2017). Porém, estão relacionados a diversos efeitos adversos, principalmente cardiovasculares, limitando seu uso a uma parcela considerável da população — inclusive pacientes diagnosticados com asma, DPOC e diabetes (GELFUSO et al., 2013).

1.4.1. Diazepam

Pertencente à classe de benzodiazepínicos, o diazepam atua como um modulador alostérico que se liga à subunidade alfa-gama do receptor e facilita o influxo neuronal do

ion cloreto, resultando na hiperpolarização de membranas pós-sinápticas e consequente depressão do SNC (CALCATERRA et al., 2014; CHAYTOR, 2007). Estudos em roedores também demonstraram inibição de acetilcolina no hipocampo e diminuição da recaptação de histamina em cérebros de camudongos, assim como supressão da liberação de prolactina em ratos (CALCATERRA et al., 2014).

As propriedades físico-químicas do fármaco — como a lipofilia e o baixo peso molecular — contribuem para suas características farmacocinéticas e boa penetração no SNC (CALCATERRA et al., 2014). O diazepam é amplamente distribuído, possui níveis elevados de ligação à proteína plasmática e biodisponibilidade de até 100% por via oral, cujo metabolismo ocorre pela CYP450, sendo afetado principalmente pela CYP2C19 e isoformas da CYP 3A. Seus metabólitos são conjugados ao ácido glicurônico e excretados pela urina (CALCATERRA et al., 2014; CHAYTOR, 2007). Os níveis de pico plasmático variam de acordo com as vias de administração, e ocorre a redistribuição do fármaco no músculo e no tecido adiposo após absorção, com uma meia-vida de 24–48 h (CALCATERRA et al., 2014; EPOCRATES, 2019). Os principais ativos metabólicos após desmetilação e hidroxilação são: nordiazepam, temazepam e oxazepam (CALCATERRA et al., 2014).

Em humanos adultos, as doses iniciais para o tratamento da ansiedade e terapia antiepiléptica variam de 2–10 mg via oral, sendo a dose máxima recomendada de 30 mg a cada 8 h (CALCATERRA et al., 2014; EPOCRATES, 2019).

O diazepam é frequentemente utilizado como padrão em estudos pré-clínicos translacionais, devido aos efeitos bem caracterizados em humanos, como ansiolítico, antiepiléptico e relaxante muscular (CALCATERRA et al., 2014; CHAYTOR, 2007). Além disso, modelos laboratoriais de ansiedade e sedação geralmente usam o diazepam como controle para estabelecer uma validade para o ensaio, por ser facilmente dosado

(normalmente de 1–10 mg/kg) e possuir efeitos reprodutíveis em roedores (CALCATERRA et al., 2014).

Os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos foram demonstrados em diversos testes, como do labirinto em cruz elevado, caixa claro/escuro e campo aberto (ENNACEUR et al., 2016). No LCE, o diazepam foi associado ao aumento da porcentagem de tempo e entrada nos braços abertos (MECHAN et al., 2002).

1.4.2. Pentilenotetrazol

O pentilenotetrazol (PTZ) induz ansiedade em humanos e animais de laboratório, e atua como antagonista não-competitivo do receptor GABA_A (CAVALLI et al., 2009; KAYIR et al., 2006).

Inicialmente descrito como uma droga convulsivante em humanos, apresenta tal atividade quando usado isoladamente (50 mg/kg ou mais) ou em doses crônicas (CAVALLI et al., 2009; ERGUL ERKEC, 2015; GODINHO et al., 2009). No entanto, dados apresentados por Godinho et al. (2009), demonstraram que o PTZ na dose de 15 mg/kg possui efeitos ansiogênicos no teste convencional de labirinto em cruz elevado.

Alguns estudos com modelos animais têm demonstrado que compostos ansiogênicos podem induzir prejuízos na memória e que tais déficits estão relacionados ao aumento da ansiedade (GODINHO et al., 2009). Baseado nestes efeitos, o PTZ se tornou uma ferramenta farmacológica interessante no paradigma de medo condicionado, uma vez que produz respostas ansiogênicas em inúmeros modelos animais, incluindo o LCE e ensaios de choque-clonflito (CAVALLI et al., 2009; GATCH et al., 2001).

1.4.3. Dizocilpina (MK-801)

A dizocilpina é um derivado benzênico que atua como antagonista não-competitivo do receptor NMDA, associado ao canal iônico, inibindo o fluxo de íons de cálcio (VARDHAN REDDY et al., 2018). Possui relatos bem descritos na literatura quanto ao efeito anticonvulsivante e de hiperatividade (ENNACEUR et al., 2011; UENO et al., 2019; VARDHAN REDDY et al., 2018; ZARRINDAST et al., 2011).

Contudo, o efeito ansiolítico dos antagonistas do receptor NMDA gera conflito em diversas pesquisas (CRISWELL et al., 1994; ENNACEUR et al., 2016). Há uma discussão quanto à interpretação do desempenho dos animais nos testes de ansiedade, nos quais a indução de hiperatividade causada pelo MK-801 e outros antagonistas de NMDA poderia ser confundida com um efeito aparentemente ansiolítico (ENNACEUR et al., 2011; 2016). Nos estudos realizados com o MK-801 no LCE o comportamento ansiolítico foi associado à exposição (ADAMEC et al., 1998; SIMPSON et al., 2010) ou ao número de entradas nos braços abertos (BARDGETT et al., 2003; CRISWELL et al., 1994; ENNACEUR et al., 2011).

1.4.4. Poliamina

O rastreamento dos efeitos clínicos de compostos bioinspirados em peçonhas de artrópodes — como aranhas, escorpiões, abelhas e vespas — que possuem alta especificidade e afinidade por substratos neuroativos vem contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento de farmacoterapias alternativas válidas (DO COUTO et al., 2012; SILVA et al., 2015).

As poliaminas são compostos de baixo peso molecular isolados de peçonhas de aranhas e vespas, com variações estruturais que incluem diferenças no número de grupos metil separando os grupos amina, presença de amidas, metilação ou hidroxilação de grupos de aminas secundárias (STROMGAARD et al., 2001). Peçonhas de aranhas

demonstraram diversos efeitos farmacológicos na transmissão sináptica, dado que apresentam elevada afinidade por canais de íons, receptores e transportadores (BELEBONI et al., 2006).

A semelhança farmacológica das poliaminas derivadas das toxinas de aranhas e vespas também é notável, atuando como antagonistas não-competitivos dos receptores de glutamato ionotrópicos, como os receptores de NMDA, AMPA e cainato (STROMGAARD et al., 2001).

Luiz et al. (2006) avaliou a atividade anticonvulsivante e ansiolítica de um componente isolado da peçonha da aranha *Parawixia bistriata*, o qual apresenta inibição indireta da atividade GABAérgica, e demonstrou resposta ansiolítica dose-dependente nos testes de LCE e compartimento claro-escuro. Peptídeos neuroativos derivados da peçonha das vespas sociais *Polybia paulista* (DO COUTO et al., 2012) e *Synoeca surinama* (GOMES et al., 2016) também demonstraram efeito ansiolítico dose-dependente para o teste de LCE. Uma molécula isolada da peçonha da vespa *Agelaia vicina* demonstrou ação no circuito neural de GABA na modulação da resposta de medo em um estudo de transtorno de pânico (DE OLIVEIRA et al., 2005).

O relatório científico da poliamina (dados não publicados) foi o primeiro estudo realizado para análise do efeito nociceptivo do peptídeo isolado da peçonha da aranha *Acanthoscurria atrox*. A peçonha da aranha foi obtida por meio de estimulação elétrica da região basal das quelíceras, coletada em tubos de polietileno e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Os componentes desta peçonha foram isolados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizado em um sistema Waters Delta Prep, constituído por um controlador automático de gradiente (modelo 4.000), um detector UV-Vis (modelo 486), um injetor manual e um registrador Servogor (modelo 120). Foi utilizada uma coluna semi-preparativa Vydac 218TP510 (Hesperia, CA, USA)

utilizando 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, como solvente A e 0,1% de TFA em acetonitrila, como solvente B, em gradiente linear, com fluxo de 1,5 mL/min. A absorvância foi monitorada a 216 e 280nm e as frações coletadas manualmente e imediatamente secas a vácuo.

Os resultados deste relatório sugeriram um possível mecanismo de ação nas vias descendentes de modulação da dor, promovida pela ação direta em canais iônicos de cálcio, sódio ou potássio. Não há ainda trabalhos publicados em relação à investigação dos efeitos da poliamina presente nessa peçonha.

Com isso, baseado nos referenciais teóricos existentes e nos mecanismos de ação propostos para as poliaminas, surge a hipótese do possível efeito ansiolítico desse composto isolado da peçonha da aranha *A. atrox*.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da poliamina, um peptídeo presente na peçonha da aranha caranguejeira *Acanthoscurria atrox*, em camundongos submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado e de campo aberto, comparado ao efeito do diazepam, PTZ e MK-801.

2.2. Objetivos específicos

Analisar os parâmetros comportamentais para as doses de 0,5 nmol, 2,5 nmol e 5 nmol de poliamina (i.c.v.) nos testes de labirinto em cruz elevada e de campo aberto.

Comparar os efeitos das três doses de poliamina com os efeitos do diazepam (2 mg/kg, i.p.) nos testes de labirinto em cruz elevada e de campo aberto.

Comparar os efeitos das três doses de poliamina com os efeitos do PTZ (30 mg/kg, i.p.) nos testes de labirinto em cruz elevada e de campo aberto.

Comparar os efeitos das três doses de poliamina com os efeitos do MK-801 (0,15 µg/kg, s.c.) nos testes de labirinto em cruz elevada e de campo aberto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos aqui descritos foram executados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e só foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA-UnB) (UnBDOC n° 73742/2008 e n° 43779/2007, em anexo).

Os testes escolhidos foram realizados de acordo com os equipamentos já adquiridos/existentes no Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília (Neuropharma/UnB).

3.1. Sujeitos

Foram utilizados 84 camundongos ingênuos da espécie *Mus musculus*, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB/UnB). Todos os sujeitos foram submetidos a uma neurocirurgia para a implantação de uma cânula-guia no ventrículo lateral direito, onde foi administrado o peptídeo. Os animais foram anestesiados para implantação da cânula-guia.

Os camundongos foram divididos em 7 grupos: veículo (n = 12), peptídeo na dose de 0,5 nmol (n = 12), peptídeo na dose de 2,5 nmol (n = 12), peptídeo na dose de 5 nmol (n = 12), diazepam (n = 12), pentilenotetrazol (n = 12) e MK-801 (n = 12). O peptídeo foi administrado por via intracérebroventricular (i.c.v.) com auxílio de uma bomba de infusão. O grupo diazepam (2 mg/kg), administrados via intraperitoneal (i.p.), e o grupo MK-801 (0,15 µg/kg), administrado via subcutânea (s.c.), foram os controles ansiolíticos. O grupo pentilenotetrazol (30 mg/kg) foi o grupo ansiogênico, administrado via intraperitoneal (i.p.). O grupo veículo (água Mili-Q®, 1 mL/kg) foi o controle, administrado via subcutânea (s.c.).

3.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg) e xilasina (15 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) e colocados em um aparelho estereotáxico para realização do procedimento cirúrgico. Em seguida, a região da cabeça foi submetida à assepsia, tricotomia, anestesia local com cloridrato de lidocaína e hemitartrato de norepinefrina por via subcutânea (s.c.) e remoção da pele para exposição do crânio.

Foram tomadas as medidas estereotáxicas necessárias para o posicionamento correto para perfuração óssea e implantação da cânula-guia no ventrículo lateral direito, utilizando coordenadas estereotáxicas de -0,2 mm (anteroposterior), -1,0 mm (mesolateral) e -2,3 mm (dorsoventral), em relação ao Ponto de Bregma, baseado na literatura de Paxinos e Watson (2004). Para auxiliar na permanência do revestimento craniano com acrílico dental autopolimerizante e contrabalancear a cânula-guia quanto à manutenção do equilíbrio do animal, foi adicionado um parafuso na área contralateral ao local da implantação.

Os roedores foram mantidos no biotério do IB/UnB sob condições adequadas para recuperação da cirurgia.

3.3. Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado consiste em dois pares de braços dispostos perpendicularmente um ao outro, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada, sendo dois abertos e dois envolvidos por paredes laterais, com 38,5 cm de altura (Figura 2).

Cada animal foi colocado no centro do labirinto, após seu respectivo tratamento, o qual foi administrado 15 min antes do teste, com exceção do diazepam, que foi

administrado 30 min antes. Tempos elegidos devido aos picos de ação de cada substância escolhida, para avaliação de seus efeitos em ambos os testes. Os camundongos foram filmados por 5 min e foi contabilizado manualmente o tempo em cada braço. A análise dos vídeos foi realizada por um único observador, diferente do experimentador, com o auxílio do software Any-maze Video Tracking System 2019, versão 6.16.

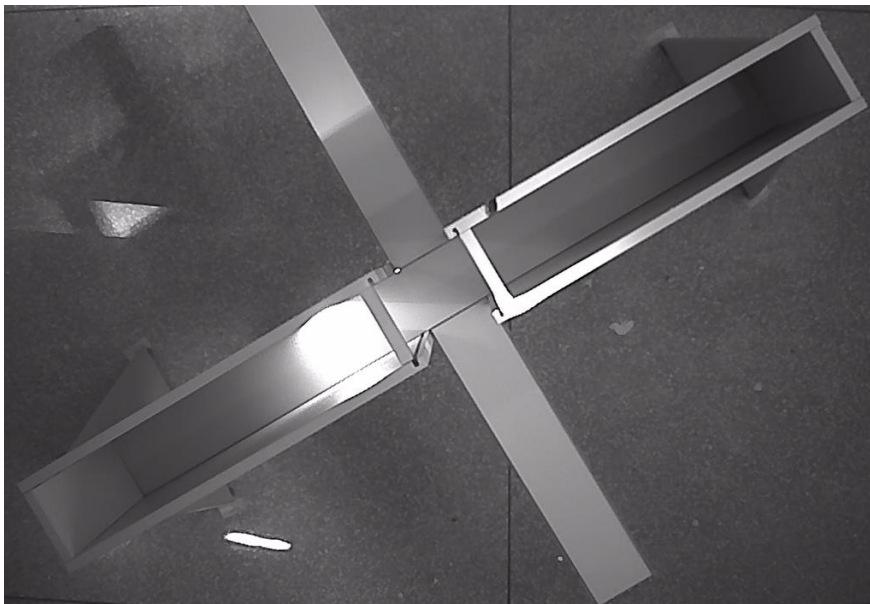


Figura 2 – Labirinto em cruz elevado utilizado durante os testes, filmado de cima.

3.4. Teste de Campo Aberto

O campo aberto consiste em uma arena circular de 55 cm de diâmetro e 48,5 cm de altura, dividido em 18 quadrantes, além do círculo central (Figura 3).



Figura 3 – Campo aberto utilizado durante os testes, filmado de cima.

Cada animal foi colocado no centro do aparato, logo após o teste de labirinto em cruz elevado. Os camundongos foram filmados por 15 min e foram contabilizados manualmente as frequências dos comportamentos de exploração, imobilidade, autolimpeza e elevação (descritos na Tabela 1), além de tempo dos animais nas áreas periféricas e centrais da arena. A análise dos vídeos foi realizada por um único observador, diferente do experimentador, com o auxílio do software Any-maze Video Tracking System 2019, versão 6.16.

Tabela 1. Descrição dos comportamentos considerados no teste do campo aberto.

Comportamento	Descrição
Imobilidade	Ficar imóvel
Exploratório	Cheirar, caminhar
Autolimpeza	Limpar focinho, patas anteriores ou posteriores, genitais, cauda, cabeça, dorso e ventre
Elevação	Permanecer equilibrado nas duas patas posteriores, apoiado ou não nas paredes da arena

3.5. Verificação da posição da cânula-guia

Ao final dos testes experimentais, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico 120 mg/kg via i.p., seguido por perfusão via transcardíaca com 50 mL de solução salina (0,9%) e 100 mL de solução fixadora de formaldeído (4%).

Os cérebros dos roedores foram retirados e mantidos em solução fixadora por 24 h e em seguida, colocados em solução de sacarose (30%) com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) por 48 h. Após estes períodos, foram realizados cortes coronais seriados e selecionados de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2004), identificados e mantidos em solução anti-freezing até processamento.

Para verificação da posição correta da implantação da cânula-guia e injeção dos peptídeos, foi administrada pela cânula-guia o corante de azul de metileno para marcação, visualização e avaliação das estruturas seccionadas através de um microscópio de luz.

Foram analisadas a presença de coloração no ventrículo lateral direito ou na cicatriz correspondente ao local de implantação da cânula.

3.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism® 8.0 (San Diego, EUA). Os resultados obtidos do teste do labirinto em cruz elevado e de campo aberto com distribuição normal foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Dunnett, considerando-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito da poliamina no teste de labirinto em cruz elevado

O efeito ansiolítico da poliamina nas doses de 0,5 nmol, 2,5 nmol e 5 nmol administradas via i.c.v. foi avaliado pelo teste de labirinto em cruz elevado. ANOVA mostrou que houve diferença significativa no tempo de permanência nos braços abertos [$F_{(6,34)} = 4, p < 0,01$] e o pós-teste de Dunnett mostrou que os animais tratados com PTZ permaneceram menos tempo nos braços abertos quando comparados com o controle (Figura 4). Foi observada também diferença significativa entre o controle e os animais tratados com PTZ [$F_{(6,33)} = 4, p < 0,01$], que permaneceram mais tempo nos braços fechados (Figura 5). Não houve diferença estatística entre os grupos de diazepam, MK-801 e as três doses de poliamina para o tempo de permanência em nenhum dos locais do labirinto.

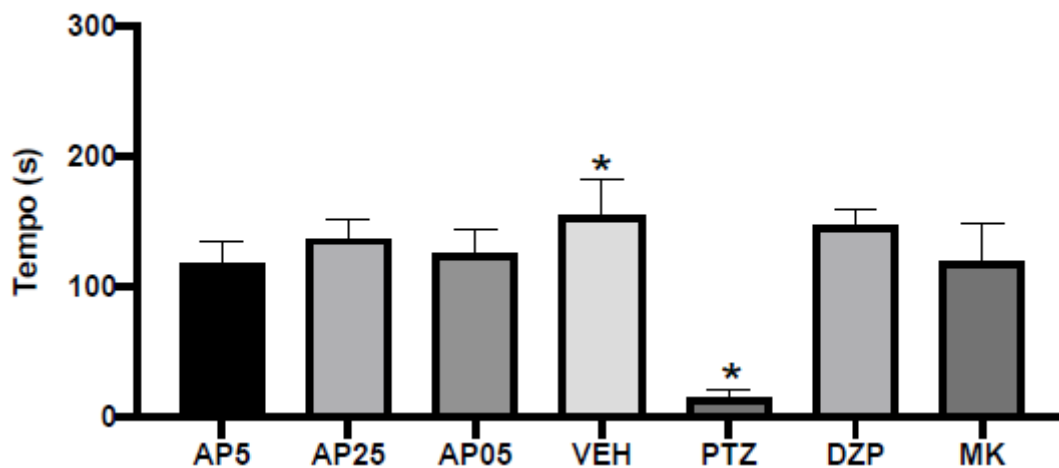


Figura 4 – Tempo (em segundos) de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto. Barras representam as médias (barras de erro, SEM). Os animais tratados com PTZ permaneceram menos tempo nos braços abertos quando comparados com o controle (*).

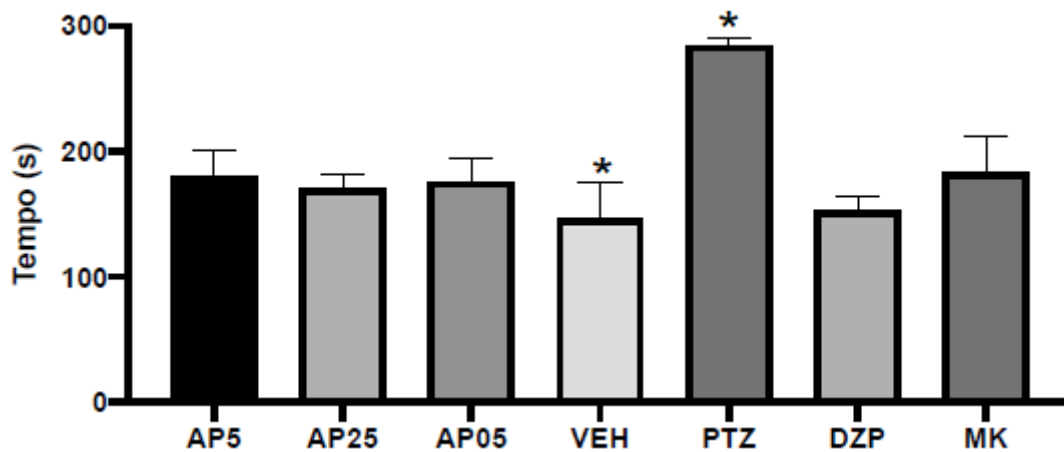


Figura 5 – Tempo (em segundos) de permanência dos animais nos braços fechados do labirinto. Barras representam as médias (barras de erro, SEM). Os animais tratados com PTZ permaneceram mais tempo nos braços fechados quando comparados com o controle (*).

4.2. Avaliação da alteração dos comportamentos espontâneos

A alteração dos comportamentos espontâneos da poliamina foi avaliada pelo teste de campo aberto por meio dos parâmetros de frequências dos comportamentos de exploração (Figura 6), inatividade (Figura 7), autolimpeza (Figura 8) e elevação (Figura 9), e do tempo de permanência dos animais nas áreas periféricas (Figura 10) e centrais da arena (Figura 11). ANOVA não mostrou diferença significativa para nenhum dos tratamentos — exploração [$F_{(6,40)} = 1.33, p > 0,05$], inatividade [$F_{(6,40)} = 1.28, p > 0,05$], autolimpeza [$F_{(6,40)} = 1.34, p > 0,05$], elevação [$F_{(6,40)} = 1.34, p > 0,05$], tempo nas áreas periféricas [$F_{(6,40)} = 1.41, p > 0,05$] e tempo nas áreas centrais [$F_{(6,40)} = 1.43, p > 0,05$].

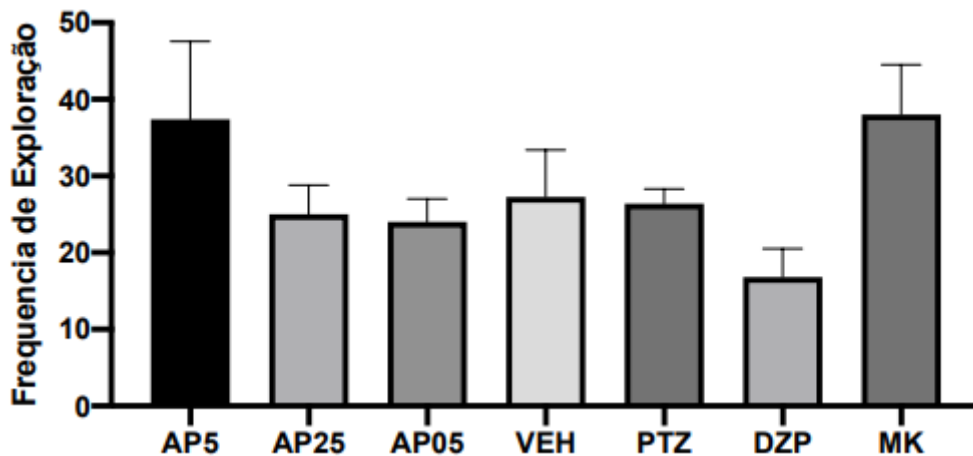


Figura 6 – Frequência de exploração dos animais durante todo o teste de campo aberto. Barras representam as médias (barras de erro, SEM).

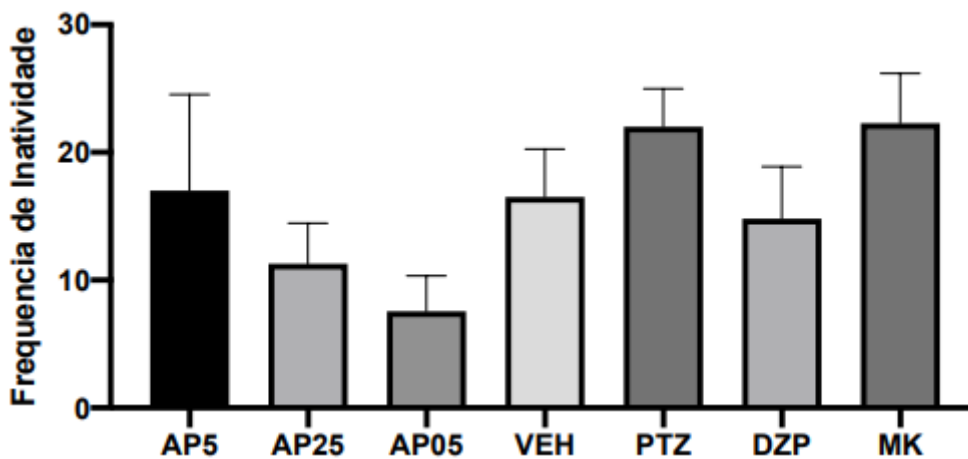


Figura 7 – Frequência de inatividade dos animais durante todo o teste de campo aberto. Barras representam as médias (barras de erro, SEM).

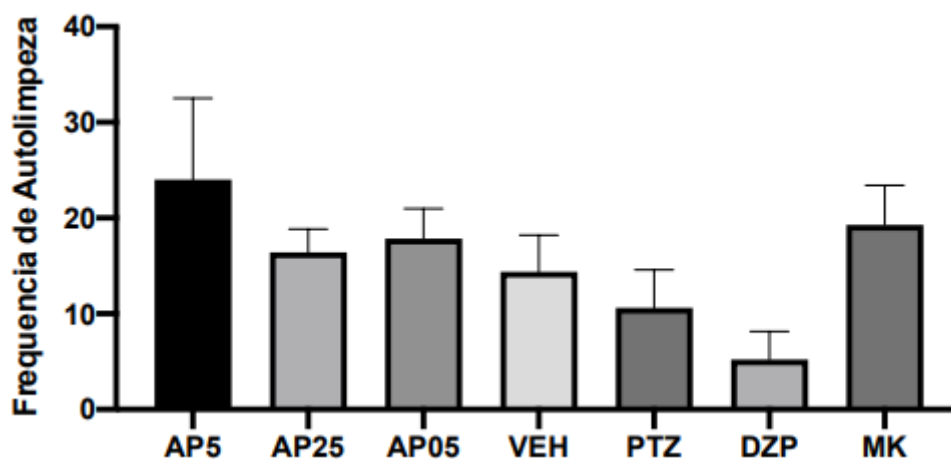


Figura 8 – Frequência de autolimpeza dos animais durante todo o teste de campo aberto. Barras representam as médias (barras de erro, SEM).

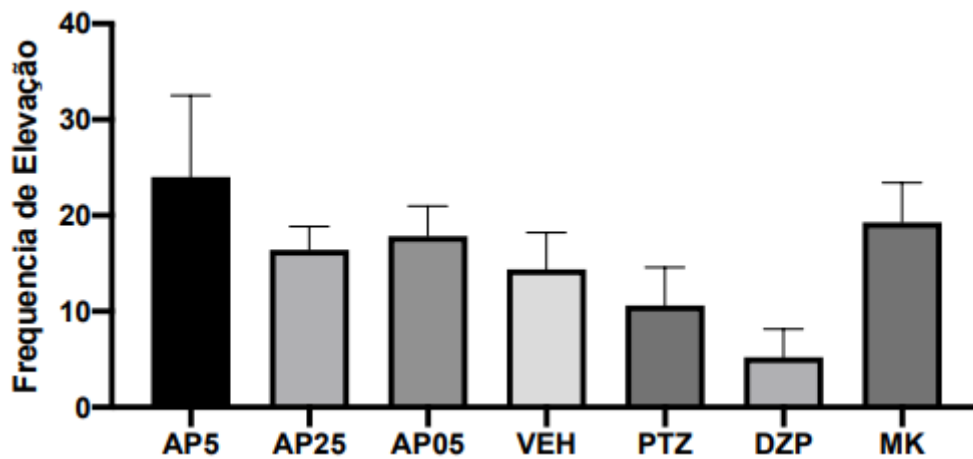


Figura 9 – Frequência de elevação dos animais durante todo o teste de campo aberto. Barras representam as médias (barras de erro, SEM).

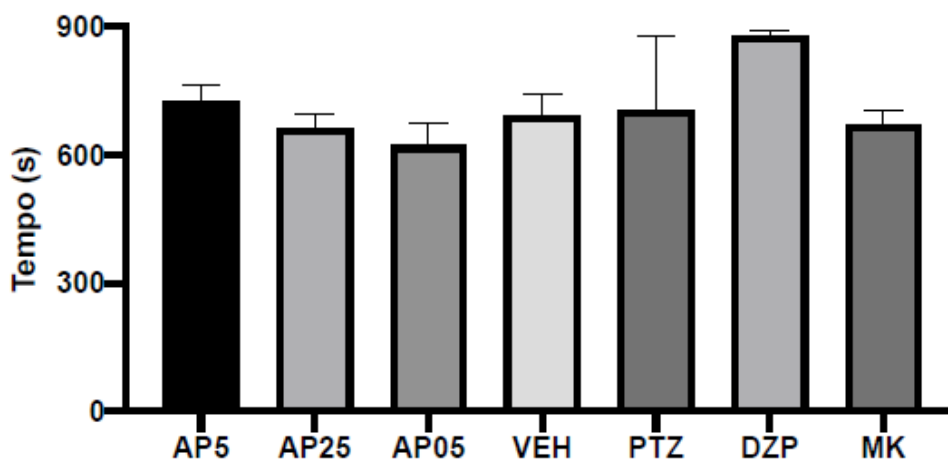


Figura 10 – Tempo (em segundos) de permanência dos animais na área periférica da arena. Barras representam as médias (barras de erro, SEM).

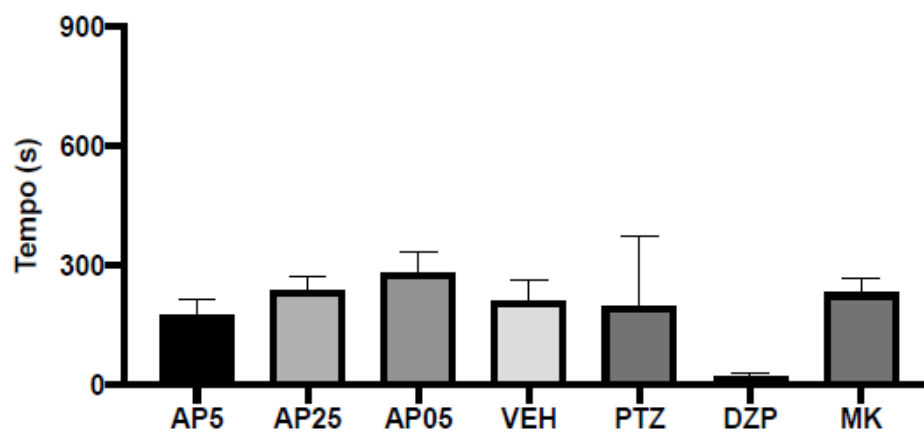


Figura 11 – Tempo (em segundos) de permanência dos animais na área central da arena. Barras representam as médias (barras de erro, SEM).

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a poliamina não possui o efeito ansiolítico esperado para o teste de LCE em nenhuma das doses utilizadas, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos tratados com o neuropeptídeo e o grupo veículo. Também não houve diferença significativa entre os tratamentos da poliamina e o controle ansiolítico. Em relação à avaliação dos comportamentos espontâneos, não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos analisados no teste de campo aberto.

Em um estudo de Beleboni et al. (2006), compostos isolados da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* demonstraram atividade primária e direta nos transportadores de GABA e glicina, inibindo atividade de ambos. Aird et al. (2016) isolou uma poliamina da peçonha da cobra *Protobothrops mucrosquamatus*, a espermina, e analisou revisões de possíveis mecanismos de interação desse componente com receptores NMDA, AMPA, GABA, nicotínicos e muscarínicos, além de diversos canais de membrana.

A espermina age em múltiplos sítios do receptor de NMDA em neurônios do hipocampo de ratos, podendo também agir no bloqueio ou potenciação da permeabilidade de íons, provavelmente advinda de um aumento da afinidade da glicina pelo receptor NMDA. Outros estudos também apontam atividade no receptor NMDA e no aumento da afinidade de ligação do MK-801 ao mesmo (AIRD et al., 2016).

No entanto, apesar da interação dessa poliamina com receptores NMDA, estudos sugerem um possível efeito excitatório no SNC, que levaria a convulsões clônicas e tremores no corpo de camundongos (AIRD et al., 2016). Tal teoria gera contradição com os relatos na literatura sobre antagonistas de receptores NMDA e seus efeitos anticonvulsivantes (LILJEQUIST et al., 1991). Dessa forma, o estudo sobre as poliaminas presentes em peçonhas — e da teoria da excitotoxicidade dos receptores NMDA — é

essencial para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação desses compostos (AIRD et al., 2016).

Similar aos achados contraditórios da poliamina, alguns estudos colocam também em questão a real interpretação dos efeitos do MK-801. Nos diversos testes animais de ansiedade, o MK-801 e outros antagonistas de NMDA demonstraram induzir hiperatividade, a qual pode ser confundida com um efeito aparentemente ansiolítico (ENNACEUR et al., 2011; 2016). O tratamento subcrônico com MK-801 em um estudo de Simpson et al. (2010) demonstrou pouco impacto no teste de ansiedade baseado no LCE. Outros estudos em diferentes espécies, doses e vias de administração para o teste de LCE demonstraram efeitos confrontantes em relação ao MK-801.

Wiley et al. (1995) associou o possível efeito ansiolítico do MK-801 à indução de hiperatividade da droga, enquanto outros estudos, não (BARDGETT et al., 2003; CRISWELL et al., 1994; SILVESTRE et al., 1997). Ainda em relação à hiperatividade, estudos prévios relataram interferência no processo sensorial e de atenção com doses de MK-801 acima de 0,1 mg/kg ansiolítico (ENNACEUR et al., 2016). Baseado nesses e outros achados, Ennaceur et al. (2016) concluiu que em ensaios laboratoriais envolvendo testes de memória aversiva, os antagonistas do receptor de NMDA teriam atividade ansiogênica.

A hipótese do mecanismo de ação das poliaminas, em geral, estar envolvida com o antagonismo do receptor de NMDA, similar à farmacodinâmica do MK-801, sugere que os efeitos esperados neste trabalho não tenham ocorrido em função do teste laboratorial selecionado. Além disso, os parâmetros escolhidos para análise não satisfazem totalmente o critério de interpretação do comportamento de ansiedade.

Ao longo de vários anos, as características aversivas observadas em roedores quando expostos nos braços abertos do LCE têm sido consideradas suficientes para

reproduzir padrões comportamentais apontados como tipicamente ansiosos. Contudo, mais investigações são necessárias para esclarecer quais elementos poderiam influenciar no comportamento exploratório desses animais quando expostos aos braços abertos (CAROBREZ et al., 2005).

No LCE, na maioria dos casos, as mudanças na ansiedade são determinadas pelo tempo gasto nos braços abertos, mas não existe critério que determine que a evitação desta área no labirinto seja um comportamento aversivo (ENNACEUR et al., 2016). Lister (1990) propôs inicialmente que a relutância dos animais em explorar os braços abertos do LCE era uma combinação de aversão dos roedores a espaços abertos e à altura, mas outros ensaios demonstraram que, sozinhos, tais fatores não seriam estímulos ansiogênicos suficientemente intensos (CAROBREZ et al., 2005). Além disso, a tensão do animal é determinada como ansiedade baixa ou alta, independentemente do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos (ENNACEUR et al., 2016).

Seja qual for o parâmetro escolhido para se analisar comportamentos ansiosos dos animais, diversos estudos (HARADA et al., 2006; MATHIASSEN et al., 2008; O'LEARY et al., 2013; SMITH et al., 2012) não conseguiram demonstrar concordância entre as medidas de tempo e entradas nos braços abertos do labirinto. Em suma, não há confiabilidade de resultados comparativos para estudos translacionais no que diz respeito à escolha de uma única medida de ansiedade para se aferir mudanças comportamentais de roedores (ENNACEUR et al., 2016).

Aliados a todas essas evidências, há ainda trabalhos publicados que se utilizam de técnicas imuno-histoquímicas — como marcadores de função sináptica e plasticidade neural — que sugerem uma relação entre a exposição ao LCE e aumento da expressão de proteína Fos nas regiões da amígdala, hipocampo, área hipotalâmica medial e substância cinzenta periaquedutal. Tais resultados também foram encontrados após injeções

sistemáticas de drogas ansiogênicas (CAROBREZ et al., 2005; SINGEWALD et al., 2000). A hiperativação nas regiões cerebrais da amígdala e do hipocampo foram associadas a alguns tipos de transtorno de ansiedade, como TAG, fobia e TEPT, os quais possuem evidências de que podem ser estudados no LCE para maior compreensão das bases biológicas das doenças (BROOKS et al., 2015; CAROBREZ et al., 2005).

6. CONCLUSÃO

A poliamina não demonstrou diferença significativa entre os grupos testados e, portanto, não possui efeito ansiolítico para o teste de LCE. Também não houve diferença estatística entre os tratamentos no teste de campo aberto, podendo-se concluir que não houve alteração dos comportamentos espontâneos dos animais e, portanto, nenhuma das doses da poliamina demonstraram sedação ou prejuízo motor.

Apesar dos resultados obtidos não atingirem as expectativas do estudo proposto, surge o interesse de se investigar diferentes metodologias para estudos neurobiológicos translacionais que se adequem à variedade de alguns dos fatores fisiopatológicos dos transtornos de ansiedade, administrando drogas com efeitos que não gerem dúvida ou discrepância quanto à interpretação dos resultados.

Em suma, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação da poliamina e rastrear os possíveis efeitos dos compostos presentes na peçonha da aranha *A. atrox*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. (1999) NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure - Implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. **Physiology and Behavior**, 65(4-5):723-37.

Aird SD, Villar Briones A, Roy MC, Mikheyev AS. (2016) Polyamines as Snake Toxins and Their Probable Pharmacological Functions in Envenomation. **Toxins (Basel)**, 28(10).

APA (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Ed. American Psychiatric Publishing: Arlington, VA.

Bandelow B, Michaelis S, Wedekind D. (2007) Treatment of anxiety disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, 19(2):93-107.

Bardgett ME, Boeckman R, Krochmal D, Fernando H, Ahrens R, Csernansky JG. (2003) NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. **Brain Res Bull**, 60(1-2):131-42.

Beleboni RO, Guizzo R, Fontana AC, Pizzo AB, Carolino RO, Gobbo-Neto L, Lopes NP, Coutinho-Netto J, Dos Santos WF. (2006) Neurochemical Characterization of a Neuroprotective Compound from *Parawixia bistriata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine. **Mol Pharmacol**, 69(6):1998-2006.

Black JJ, Rofey DL. (2018) An overview of common psychiatric problems among adolescent and young adult females: Focus on mood and anxiety. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, 48:165-173.

Brooks SJ, Stein DJ. (2015) A systematic review of the neural bases of psychotherapy for anxiety and related disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, 17(3): 261–279.

Brunton L, Knollmann B, Hilal-Dandan R. (2017) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13th Ed. McGraw-Hill Education.

Bystritsky A, Khalsa SS, Cameron ME, Schiffman J. (2013) Current Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. **P T.**, 38(1):30-57.

Calcaterra NE, Barrow JC. (2014) Classics in chemical neuroscience: Diazepam (valium). **ACS Chem Neurosci**, 5(4):253-60.

Calhoon GG, Tye KM. (2015) Resolving the neural circuits of anxiety. **Nat Neurosci**, 18(10):1394-404.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, 29(8):1193-205.

Cavalli J, Bertoglio LJ, Carobrez AP. (2009) Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 92(4):512-8.

Chaytor A. (2007) Diazepam, in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. (1):1-2.

Correia PA, Lottem E, Banerjee D, Machado AS, Carey MR, Mainen ZF. (2017) Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. **Elife**, 6(1): 1-27.

Criswell HE, Knapp DJ, Overstreet DH, Breese GR. (1994) Effects of Ethanol, Chlordiazepoxide, and MK-801 on Performance in the Elevated-Plus Maze and on Locomotor Activity. **Alcohol Clin Exp Res**, 18(3):596-601.

de Oliveira L, Cunha AO, Mortari MR, Pizzo AB, Miranda A, Coimbra NC, dos Santos WF. (2019) Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. **Brain Res**, 1031(1):74-81.

do Couto LL, Dos Anjos LC, Araujo Mde A, Mourão CA, Schwartz CA, Ferreira LB, Mortari MR. (2012) Anticonvulsant and anxiolytic activity of the peptide fraction isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Pharmacogn Mag**, 8(32):292-9.

Ennaceur A, Michalikova S, van Rensburg R, Chazot PL. (2011) MK-801 increases the baseline level of anxiety in mice introduced to a spatial memory task without prior habituation. **Neuropharmacology**, 61(5-6):981-91.

Ennaceur A, Chazot PL. (2016) Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. **Pharmacol Res Perspect**, 4(2):e00223.

Epocrates. (2019) Diazepam Entire Monograph [Internet]. Watertown (Massachusetts). Disponível em: <http://online.epocrates.com/drugs/19210/diazepam/Monograph>.

ERGUL ERKEC O, ARIHAN O. (2015) Pentylenetetrazol Kindling Epilepsy Model. sh **Epilepsi**, 21(1):6-12.

Gomes FM, Paniago CK, Freire DO, Souza AC, Lima MR, Oliveira-Júnior NG, Franco OL, Mortari MR. (2016) Anxiolytic-like effect of a novel peptide isolated from the venom of the social wasp *Synoeca surinama*. **Toxicon**, 122:39-42.

Gatch MB, Wallis CJ, Lal H. (2001) Effects of calcium channel blockers on pentylenetetrazol drug discrimination in rats. **Alcohol**, 23(3):141-7.

Gelfuso EA, Rosa DS, Fachin AL, Mortari MR, Cunha AO, Belebani RO. (2013) Anxiety: A Systematic Review of Neurobiology, Traditional Pharmaceuticals and Novel Alternatives from Medicinal Plants. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 13(1):150-65.

Gillan CM, Fineberg NA, Robbins TW. (2017) A trans-diagnostic perspective on obsessive-compulsive disorder. **Psychol Med**, 47(9):1528-1548.

Godinho M, Ribeiro AM, Fernandes VS, Barbosa FF, Nascimento EB, Munguba H, Silva RH. (2009) A rodent model of appetitive discrimination with concomitant evaluation of anxiety-like behavior. **J Neurosci Methods**, 185(1):82-8.

Graham BM, Langton JM, Richardson R. (2011) Pharmacological enhancement of fear reduction: Preclinical models. **Br J Pharmacol**, 164(4):1230-47.

Harada K, Aota M, Inoue T, Matsuda R, Mihara T, Yamaji T, Ishibashi K, Matsuoka N. (2006) Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT_{2C} receptor antagonist FR260010: a comparison with diazepam and buspirone. **Eur J Pharmacol**, 553:171–84.

Harro J. (2018) Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behav Brain Res**, 352:81-93.

Katzung B, Trevor A. (2017) Katzung's Basic & Clinical Pharmacology, 14th Ed. McGraw-Hill Education.

Kayir H, Uzbay IT. (2006) Nicotine antagonizes caffeine- but not pentylentetrazole-induced anxiogenic effect in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 184(3-4):464-9.

Kirlic N, Young J, Aupperle RL. (2017) Animal to human translational paradigms relevant for approach avoidance conflict decision making. **Behav Res Ther**, 96:14-29.

Ledoux JE, Pine DS. (2016) Using neuroscience to help understand fear and anxiety: A two-system framework. **Am J Psychiatry**, 173(11):1083-1093.

Liljequist S, Ossowska K, Grabowska-Andén M, Andén NE. (1991) Effect of the NMDA antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. **Eur J Pharmacol**, 195(1):55-61. Lister RG. (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, 46(3):321-40.

Mathiasen LS, Mirza NR, Rodgers RJ. (2008) Strain- and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-838,417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. **Pharmacol Biochem Behav**, 90:19–36.

Mechan AO, Moran PM, Elliott M, Young AJ, Joseph MH, Green R. (2002) A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behaviour on the

elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters, and their response to diazepam. **Psychopharmacology (Berl)**, 159(2):188-95.

Moller HJ, Bandelow B, Bauer M, Hampel H, Herpertz SC, Soyka M, Barnikol UB, Lista S, Severus E, Maier W. (2015) DSM-5 reviewed from different angles: goal attainment, rationality, use of evidence, consequences—part 2: bipolar disorders, schizophrenia spectrum disorders, anxiety disorders, obsessive-compulsive disorders, trauma- and stressor-related disorders, personality disorders, substance-related and addictive disorders, neurocognitive disorders. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 265(2):87-106.

Murrough JW, Yaqubi S, Sayed S, Charney DS. (2015) Emerging drugs for the treatment of anxiety. **Expert Opin Emerg Drugs**, 20(3):393-406.

O'Leary TP, Gunn RK, Brown RE. (2013) What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? **Behav Genet**, 43(1):34–50.

Paxinos G, Watson C. (2004) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th ed. Academic Press.

Sartori SB, Landgraf R, Singewald N. (2011) The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. **Future Neurol**, 6(4):531-571.

Shin LM, Liberzon I. (2010) The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, 35(1):169-91.

Silva J, Monge-Fuentes V, Gomes F, Lopes K, dos Anjos L, Campos G, Arenas C, Biolchi A, Gonçalves J, Galante P, Campos L, Mortari M. (2015) Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. **Toxins (Basel)**, 7(8):3179-209.

Silvestre JS, Nadal R, Pallarés M, Ferré N. (1997) Acute effects of ketamine in the holeboard, the elevated-plus maze, and the social interaction test in Wistar rats. **Depress Anxiety**, 5(1):29-33.

Simpson SM, Menard JL, Reynolds JN, Beninger RJ. (2010) Post-weaning social isolation increases activity in a novel environment but decreases defensive burying and subchronic MK-801 enhances the activity but not the burying effect in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 95(1):72-9.

Singewald N, Sharp T. (2000) Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. **Neuroscience**, 98(4):759-70.

Smith KS, Engin E, Meloni EG, Rudolph U. (2012) Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABAA receptor subtypes in mice. **Neuropharmacology** 63(2):250–58.

Stevens HE, Vaccarino FM. (2015) How animal models inform child and adolescent psychiatry. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, 54(5):352-9.

Stromgaard K, Andersen K, Krogsgaard-Larsen P, Jaroszewski JW. (2010) Recent advances in the medicinal chemistry of polyamine toxins. **Mini Rev Med Chem**, 1(4):317-38.

Szechtman H, Ahmari SE, Beninger RJ, Eilam D, Harvey BH, Edemann-Callesen H, Winter C. (2017) Obsessive-compulsive disorder: Insights from animal models. **Neurosci Biobehav Rev**, 76(Pt B):254-279.

Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, 16(6):317-31.

Ueno H, Shimada A, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, Matsumoto Y, Okamoto M, Ishihara T. (2019) Attenuation Effects of Alpha-Pinene Inhalation on Mice with Dizocilpine-Induced Psychiatric-Like Behaviour. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2019(1):1-12.

Vardhan Reddy KH, Yen-Pon E, Cohen-Kaminsky S, Messaoudi S, Alami M. (2018) Convergent Strategy to Dizocilpine MK-801 and Derivatives. **J Org Chem**, 83(7):4264-

4269.

Vollmer LL, Strawn JR, Sah R. (2015) Acid-base dysregulation and chemosensory mechanisms in panic disorder: A translational update. **Transl Psychiatry**, 5(5):e572.

Walf AA, Frye CA. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, 2(2):322-8.

WHO. (2017) Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, 1:1-24.


Wiley JL, Cristello AF, Balster RL. (1995) Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Eur J Pharmacol**, 294(1):101-7.

Zarrindast MR, Nasehi M, Piri M, Heidari N. (2011) Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior. **Neurosci Lett**, 505(2):65-70.

Zarrindast MR, Nasehi M, Pournaghshband M, Yekta BG. (2012) Dopaminergic system in CA1 modulates MK-801 induced anxiolytic-like responses. **Pharmacol Biochem Behav**, 103(1):102-10.

Zhong F, Liu L, Wei JL, Hu ZL, Li L, Wang S, Xu JM, Zhou XF, Li CQ, Yang ZY, Dai RP. (2019) Brain-derived neurotrophic factor precursor in the hippocampus regulates both depressive and anxiety-like behaviors in rats. **Front Psychiatry**, 9:776.

8. ANEXOS

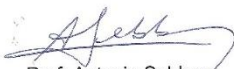


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal


Brasília, 15 de outubro de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES ANTINOCICEPTIVOS PRESENTES NA PEÇONHA DA ARANHA ACANTHOSCURRIA ATROX EM MODELOS DE INDUÇÃO DE DOR POR ESTIMULAÇÃO TÉRMICA E IDENTIFICAÇÃO DE SEU MECANISMO DE AÇÃO"**, UnBDOC nº 73742/2008, sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA




UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 13 de setembro de 2007

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO ANTICONVULSIVANTE E PERFIL NEUROFARMACOLÓGICO DE PEPTÍDEOS ISOLADOS DA PEÇONHA DA ARANHA CARANGUEJEIRA ACANTHOSCURRIA ATROX"**, UNBDOC nº 43779/2007, sob responsabilidade do Prof. Carlos Alberto Schwartz, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA