

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
FARMÁCIA

OZILEUDIANE BARROS SANTOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPLEXO METÁLICO DERIVADO DO
DIAZEPAM [(DZP)PdCl]₂ NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM
MEDO, ANSIEDADE E MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS *SWISS***

MACEIÓ

2019

OZILEUDIANE BARROS SANTOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPLEXO METÁLICO DERIVADO DO
DIAZEPAM [(DZP)PdCl]₂ NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM
MEDO, ANSIEDADE E MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS *SWISS***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Ciências
farmacêuticas da Universidade Federal
de Alagoas como requisito para
conclusão do curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Duzzioni

MACEIÓ

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

- S586a Silva, Ozileudiane Barros Santos da.
 Avaliação dos efeitos do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂
 nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e memória em camundongos
 swiss / Ozileudiane Barros Santos da Silva. – 2019.
 56 f. : il.
- Orientador: Marcelo Duzzioni.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade
Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Curso de Farmácia. Maceió,
2019.
- Bibliografia: f. 51-55.
Anexo: f. 56.
1. Ansiedade. 2. Benzodizepinicos. 3. Complexos metálicos. I. Título.

CDU: 615.038



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA

Maceió, 23 de Abril de 2019.

Declaração

DECLARO, para os devidos fins, que o Trabalho de Conclusão de Curso da acadêmica OZILEUDIANE BARROS SANTOS DA SILVA (15112151), intitulado "Avaliação dos efeitos do complexo metálico derivado do Diazepam $[(DZP)PdCl]_2$ nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e memória em camundongos Swiss", foi apresentado no dia 23 de abril de 2019 no Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas. O trabalho foi realizado sob orientação do docente Prof. Dr. Marcelo Duzzioni (ICBS/UFAL) e teve como banca examinadora:

TITULARES:

Prof^a. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro - ICF/UFAL

Dra. Mykaella Andrade de Araújo - Faculdade Pitágoras

Atenciosamente,

Prof. Dr. Alfredo Dias de Oliveira Filho

Coordenador de TCC – Curso de Farmácia

*“Dedico a minha mãe pelo apoio incondicional durante essa trajetória, pelos ensinamentos
tão valiosos quanto os adquiridos na graduação.”*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho faz parte do fechamento de mais um ciclo em minha vida. Ciclo difícil e longo, mas que hoje eu tenho a certeza de que foi concluído no tempo certo. Não poderia ter sido realizado sem a cooperação e o apoio de muitos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão do mesmo, e aos quais agradeço imensamente. Destaco o agradecimento:

A Deus, pela sua infinita misericórdia em cada dia dessa minha trajetória, pelo presente inesperado que foi esse curso e, principalmente, por ter cuidado nos mínimos detalhes para que eu conseguisse a realização desse sonho. Por ter me capacitado para alcançar cada etapa e por ter colocado em minha vida as pessoas certas para me ajudar.

À minha família, minha maior riqueza! Que algum dia eu consiga retribuir os gestos de apoio e carinho que recebi de cada um. Agradeço a minha vó (Vandete) pela sabedoria em nos deixar sempre tão próximos. Aos meus tios, primos que sempre foram presentes na minha vida. Ao meu pai (Oziel), meus irmãos (Ozilêa, Junior e Leudson) e aos meus cunhados (Alberto, Késia e Maria) que, além do apoio, me presentearam com o melhor amor do mundo! Meus pequeninhos, sobrinhos lindos (Murillo, Estela, Vinícius, Gustavo, Eloah e Helena) que me fazem tão bem com esse amor tão puro.

Em especial, quero agradecer a minha MÃE (sim, com todas as letras em caixa alta) pela confiança, pelo apoio, pelo incentivo, pelo esforço diário, por me fazer acreditar sempre em mim. Pelos vários conselhos recebidos, dentre os quais um foi importantíssimo nessa caminhada: “Não se perturbe com o barulho de carroças vazias”. Obrigada por sorrir comigo e por chorar também, por não ter desistido quando eu já tinha jogado a toalha. Muito obrigada por tudo!!!

Ao meu orientador: Prof. Dr. Marcelo Duzzioni, pela oportunidade, pelo respeito e confiança a mim depositados e que me proporcionaram a capacidade de crescimento científico. Agradeço principalmente pela disponibilidade e paciência em ensinar tornando mais tranquila essa caminhada.

Agradeço aos amigos que ganhei no laboratório LNFI. Que satisfação em fazer parte dessa equipe! Agradeço à Nanda pela paciência em ensinar e ensinar mais uma vez. Por ser essa pessoa tão dedicada que inspira a quem com ela convive, agradeço pelos conselhos e pela disponibilidade em ajudar. À Gabi (Gabriela Ferreira) e à Priscilla pelas mãos dadas em todos os momentos! Aprendemos muito uma com as outras e aprendemos juntas a importância do trabalho em equipe, muito obrigada meninas. À Walleska pela cooperação tão importante na realização deste trabalho. Agradeço ao Neto, ao Luiz e a Gabizinha (Gabriela Tenório) contribuições que, de igual modo, foram essenciais nessa realização.

Aos professores do curso de Farmácia da UFAL pelos ensinamentos passados ao longo do curso que foram importantes para a minha formação. Agradeço imensamente as professoras Êurica Ribeiro e Mykaella Araújo por aceitarem o convite para compor a presente banca e pelas contribuições a esse trabalho.

Aos amigos que também foram de especial importância. À Camila, que mesmo a distância torceu junto a mim pela realização desse objetivo. Àqueles que entenderam a minha ausência e sempre me apoiaram e àqueles com que fui presenteada durante o curso, que foram surgindo nos momentos certos e se tornaram essenciais em minha caminhada:

Amigos que vou levar para a vida. Que dividiram comigo toda essa correria diária tornando mais fácil a superação de cada etapa. Em especial: Valéria pelos abraços insistentes (rsrs), pelo apoio, pela colaboração sempre e, principalmente, pela amizade sincera e despretensiosa que ultrapassa a faculdade. A esse grupinho que foi tão importante desde o início do curso e a quem tenho muita gratidão (Josy, Valdira, Larissa, Aline, Wesley, Elaine, Rozi e Rômulo) e a outro grupinho que me acolheu tão bem nessa etapa final e com quem dividi momentos muito especiais que fortaleceram uma amizade sincera (Luciana, Clara, Rafa, Shirley, Nathan, Uriel e Alessandra).

Muito obrigada!!

RESUMO

O desafio na terapia dos transtornos de ansiedade é identificar medicamentos alternativos eficazes e com melhor tolerabilidade. Alguns estudos têm demonstrado que a síntese e a semi-síntese de compostos metálicos derivados dos benzodiazepínicos (BDZs) apresentam características desejáveis dos novos fármacos ansiolíticos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e memória em camundongos *Swiss*. Para isso, camundongos *Swiss* fêmeas foram tratados (i.p.) com o veículo de preparação das substâncias (grupo controle; NaCl 0,9%; Tween80 0,5%) ou [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg). Após 30 min do tratamento, os animais foram submetidos aos testes de ansiedade [labirinto em cruz elevado (LCE) ou a caixa claro-escuro (CCE)], locomoção [campo aberto (CA)] e memória [step-down (SD)]. O papel do receptor GABA_A no efeito do tipo ansiolítico do complexo [(DZP)PdCl]₂ foi avaliado após o pré-tratamento com flumazenil (2 mg/Kg, i.p) + [(DZP)PdCl]₂ (melhor dose ansiolítica). No LCE, o [(DZP)PdCl]₂ (0,15mg/Kg) aumentou significativamente a %TBA e a %EBA, quando comparado ao grupo controle, indicando um comportamento do tipo ansiolítico. O efeito do tipo ansiolítico não foi observado na CCE. Nenhuma alteração locomotora foi encontrada no teste do CA, como também, nenhuma alteração amnésica no SD. O flumazenil *per se* não alterou nenhum dos parâmetros avaliados no LCE, mas foi capaz de bloquear o efeito do tipo ansiolítico do [(DZP)PdCl]₂, indicando que este efeito ansiolítico ocorre via sítio BDZ no complexo receptor GABA_A. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o [(DZP)PdCl]₂ apresenta um efeito do tipo ansiolítico no LCE e que esse efeito não sofre influência da atividade locomotora, nem promove efeito amnésico. Além disso, o efeito do tipo ansiolítico do composto [(DZP)PdCl]₂ é mediado por ativação do receptor GABA_A. Novos estudos devem ser realizados para avaliar a segurança do composto [(DZP)PdCl]₂.

Palavras-chave: Ansiedade, benzodiazepínicos, complexos metálicos.

ABSTRACT

The challenge in the therapy of anxiety disorders is to identify effective alternative medicines with better tolerability. Some studies have shown that the synthesis and semi-synthesis of metal compounds derived from benzodiazepines (BDZs) exhibit these desirable characteristics of the novel anxiolytic drugs. Based on that, the objective of this work was to evaluate the effects of intraperitoneal (i.p.) administration of metal complex derived from diazepam [(DZP)PdCl]₂ on fear, anxiety and memory related behaviors in female *Swiss* mice. For this, female *Swiss* mice were treated (i.p.) with the preparation drug vehicle (Control group; NaCl 0,9%; Tween 80 0,5%) or [(DZP)PdCl]₂ (0.015, 0.025 and 0.15 mg / kg). After 30 min of treatment, the animals were submitted to anxiety tests [elevated plus maze (EPM) or light-dark box (LDB)], locomotion [open field (OF)] and memory [step-down (SD)]. The role of the GABA_A receptor in the anxiolytic-like effect of the [(DZP)PdCl]₂ complex was evaluated after pretreatment with flumazenil (2 mg / kg, i.p) + [(DZP)PdCl]₂ (best anxiolytic dose). In the LCE, [(DZP)PdCl]₂ (0.15mg / kg) increased significantly the %TBA and %EBA, when compared to the control group, indicating an anxiolytic-like behavior. The effect of the anxiolytic-like was not observed in the LDB. No locomotor change was found in the OF test, as well as no amnesic change SD. Flumazenil *per se* did not alter any of the parameters evaluated in the EPM, but was able to block the anxiolytic-like effect of [(DZP)PdCl]₂, indicating that this anxiolytic-like effect occurs by way of the BDZ site in the GABA_A receptor complex. Our results demonstrated for the first time that [(DZP)PdCl]₂ presents an anxiolytic-like effect in EPM and this effect is not influenced by locomotor activity nor does it promote amnesic effect. In addition, the anxiolytic type effect of the compound [(DZP)PdCl]₂ is mediated by activation of the GABA_A receptor. Further studies should be performed to evaluate the safety of compound [(DZP)PdCl]₂.

Key words: Anxiety, benzodiazepines, metal complexes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura química do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂	31
Figura 2.	Teste do labirinto em cruz elevado (LCE) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).....	32
Figura 3.	Teste da caixa claro-escuro (CCE) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).....	33
Figura 4.	Teste do campo aberto (TCA) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).....	34
Figura 5.	Teste do step-down (SD) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).....	34
Figura 6.	Delineamento experimental realizado para avaliar a atividade do tipo ansiolítica no LCE e a atividade locomotora no TCA do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015; 0,025 ou 0,15 mg/Kg).....	35
Figura 7.	Delineamento experimental realizado para avaliar a atividade do tipo ansiolítica na CCE do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015; 0,025 ou 0,15 mg/Kg).....	36
Figura 8.	Delineamento experimental realizado para avaliar efeito amnésico no SD do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015; 0,025 ou 0,15 mg/Kg).....	37
Figura 9.	Delineamento experimental realizado para avaliar possível modulação gabaérgica no efeito tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,15 mg/Kg).....	38
Figura 10.	Fotomicrografia de esfregaço vaginal de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas na fase diestro do ciclo estral.....	39
Figura 11.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no labirinto em cruz elevado (LCE).....	40
Figura 12.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no tempo de permanência no compartimento claro no teste da caixa claro-escuro (CCE).....	41
Figura 13.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no teste do campo aberto (CA).....	42

Figura 14.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no step-down (SD).....	43
Figura 15.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,15mg/Kg) e do flumazenil (2mg/Kg) no labirinto em cruz elevado (LCE).....	44
Figura 16.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,15mg/Kg) e do flumazenil (2mg/Kg) no teste do campo aberto (CA).....	45
Figura 17.	Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), N° 29/2018.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no número de entradas nos braços fechados (EBF) e nos parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).....	40
Tabela 2.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE).....	41
Tabela 1.	Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl] ₂ (0,15mg/Kg) e do flumazenil (2mg/Kg) no número de entradas dos braços fechados (EBF) e nos parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V).....	21
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BHE	Barreira hematoencefálica
BZDs	Benzodiazepínicos
CA	Campo aberto
CCE	Teste da caixa claro-escuro
CRH	Hormônio corticotropina
CRUZ	Cruzamentos
DSM-II	Manual Estatístico e Diagnóstico de Distúrbios Mentais, volume 2
DSM-V	Manual Estatístico e Diagnóstico de Distúrbios Mentais, volume 5
DZP	Diazepam
EBA	Entrada nos braços abertos
EBF	Entrada nos braços fechados
GABA	Neurotransmissor Ácido γ -aminobutírico
GABA_A	Receptor do GABA do tipo A
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IRNS	Inibidores da recaptação de noradrenalina e serotonina
IRSS	Inibidores da recaptação seletiva de serotonina
LCE	Labirinto em cruz elevado
LECE	Latência de entrada no compartimento escuro
MAO-A	Monoamino oxidase do tipo A
nECE	Número de entradas no compartimento escuro
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
pSAP	Do inglês protected streched attend posture

REA	Do inglês rearing
SCD	Sisntema cerebral de defesa
SD	Step-down
SIC	Sistema de inibição comportamental
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TAS	Transtorno de ansiedade social
TBA	Tempo nos braços abertos
TCC	Tempo no compartimento claro
TP	Transtorno de pânico
uHD	Do inglês unprotected head-dipping

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. ANSIEDADE	19
2.3. EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	22
2.4. MODELOS ANIMAIS PARA ANSIEDADE	23
2.5. TRATAMENTO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	25
2.5.1. Farmacoterapia disponível para os transtornos de ansiedade	26
2.5.2. Novas alternativas farmacológicas para os transtornos de ansiedade	27
3. OBJETIVOS	30
3.1. Geral	30
3.2. Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Animais	31
4.2. Drogas e soluções	31
4.3. Determinação do ciclo estral	32
4.4. Testes comportamentais utilizados	32
4.4.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE):	32
4.4.2. Teste da caixa claro-escuro (CCE)	33
4.4.3. Teste do campo aberto (CA)	33
4.4.4. Step-down (SD)	34
4.5. Delineamento experimental	35
4.5.1. <i>Experimento 1 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivados do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado</i>	35
4.5.2. <i>Experimento 2 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) na atividade locomotora espontânea de camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do campo aberto.</i>	36
4.4.3. <i>Experimento 3 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste da caixa claro-escuro.</i>	36
4.5.4. <i>Experimento 4 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivados do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) nos</i>	

<i>comportamentos relacionados com a memória em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do step-down.</i>	37
<i>4.5.5. Experimento 5 - Avaliação de se o efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ em camundongos Swiss fêmeas ocorre via receptores GABA(A), através do pré-tratamento com flumazenil [antagonista competitivo do sítio BZD do receptor GABA(A)].</i>	37
4.6. Análise estatística	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Ciclo estral	39
5.2. Labirinto em cruz elevado (LCE)	39
8.3. Caixa claro-escuro (CCE)	41
8.4. Teste do campo aberto (CA)	41
8.5. Step-down (SD)	42
8.6. Modulação gabaérgica do efeito tipo ansiolítico pelo bloqueio com o flumazenil (antagonista dos benzodiazepínicos)	43
8.6.1. Labirinto em cruz elevado	43
8.6.2. Teste do campo aberto (CA)	45
6. DISCUSSÃO	46
6.1. Efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂	46
6.2. Efeito do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ sobre a atividade locomotora e na memória	48
6.3. Modulação gabaérgica no efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂	49
7. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	56

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é caracterizada como um mecanismo de defesa do organismo em resposta as situações de ameaça desconhecida (CASTILLO et al., 2000; GRAEFF, 1970). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 3,6% da população mundial apresenta algum tipo de transtorno de ansiedade, sendo o mais acometido o gênero feminino; cerca de 7,7% comparado aos homens (3,6%). No Brasil, 9,3% da população é afetada por essa doença, sendo o país com maior prevalência de transtornos de ansiedade do mundo (WHO, 2017).

O desencadeamento dos transtornos de ansiedade acontece tanto na esfera psicológica, onde são afetadas as áreas emocional e cognitiva, como na esfera fisiológica, induzida pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A ativação do eixo HPA é responsável por promover reações coordenadas pelo sistema nervoso simpático e parassimpático (BRAGA, 2010; GRAEFF, 1970). A resposta fisiológica da ansiedade patológica é mediada por vários neurotransmissores e o ácido gama-aminobutírico (GABA) consiste em um dos neurotransmissores mais estudados (OLSEN, 1981).

Os benzodiazepínicos (BDZs) são bastante utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade, seu mecanismo de ação ocorre por ligação alostérica ao sítio BDZ no complexo receptor GABA_A, promovendo uma modificação conformacional do receptor que leva a um aumento da afinidade entre o receptor e o GABA (ARIKIAN; GORMAN, 2001; GRIEBEL; HOLMES, 2013). Os BDZs, no entanto, promovem vários efeitos indesejados como a sedação, dependência e a perda da memória. Tais fatores tem estimulado a busca por novas moléculas com atividade ansiolítica mais seguras e com menor incidência de efeitos indesejados (BANDELOW; MICGAELIS; WEDEKIND, 2017; GURWITZ; WEIZMAN, 2005).

Uma alternativa na descoberta de novos fármacos ansiolíticos tem sido a síntese de compostos organometálicos, através da qual um fármaco é induzido a formação de um complexo coordenado por um metal (BARROS et al., 2016). Essa técnica já é bastante empregada na síntese de novos fármacos e foi a princípio utilizada na síntese da cisplatina [PtCl₂(NH₃)₂], um antitumoral, além de outros medicamentos disponíveis para tratamento de diversas doenças são produzidos através dessa técnica (ROCHA et al., 2011). Por exemplo, trabalhos recentes tem demonstrado a eficácia de compostos organometálicos de paládio (II) derivados so BZD diazepam – [(DZP)PdCl]₂ e [(DZP)PdCl]₂ - na redução do número e

gravidade de crises epilépticas em camundongos (BARROS et al., 2016). Esse resultado nos fez pensar que os outros efeitos clínicos observados com o uso dos BZDs poderiam ser observados, dentre os quais o ansiolítico, e ainda com a vantagem de apresentar menos efeitos indesejados, como déficits no aprendizado e memória e na atividade locomotora.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e memória em camundongos *Swiss*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANSIEDADE

A ansiedade é definida como uma emoção humana composta de fatores emocionais, comportamentais e fisiológicos (BRAGA, 2010; GRAEFF, 1970). A ansiedade é um impulso motivacional fundamental em muitas formas de comportamento e, como o medo, tem importante significado adaptativo e evolutivo. Entretanto, ansiedade e medo são conceitualmente diferentes. Enquanto no medo a fonte de ameaça é conhecida, na ansiedade o perigo não é tão evidente, porém vago e persistente estando ligado a uma expectativa futura desproporcional. Esses dois estados emocionais possuem caráter adaptativo, sendo essenciais para evitar que o organismo sofra algum dano físico ou psicológico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; GRAEFF, 1970).

Além disso, o medo está geralmente associado a comportamentos de fuga e pensamentos de perigo iminente que necessitam de uma ativação aumentada do sistema nervoso simpático, necessária para luta e fuga. Já na ansiedade existe a associação de sintomas físicos *e.g.* tensão muscular e aumento da vigilância, além de comportamentos relacionados à esquiva e a cautela como forma de preparar o indivíduo para um perigo futuro (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

De maneira geral a ansiedade pode ser considerada normal ou patológica. Essa classificação é baseada na *curva de Yerkes-Dodson* que associa os níveis de ansiedade com o desempenho ou performance do indivíduo, propondo um limiar que os distingue. Dessa forma, a ansiedade normal estaria diretamente relacionada a melhora da execução de tarefas do indivíduo. Em contrapartida, a ansiedade patológica seria alcançada ao se ultrapassar esse limiar de ansiedade considerável saudável e dessa forma desencadearia prejuízos à saúde mental e física que são característicos dos distúrbios de ansiedade (GRAEFF, 1970; TEIGEN, 1994).

A ansiedade patológica promove alterações psicológicas e fisiológicas que são responsáveis pelos sintomas característicos dessa patologia. Na esfera psicológica algumas reações emocionais são características dos quadros de ansiedade *e.g.* a angústia, identificada pela sensação de estrangulamento ou constrição, a preocupação excessiva, aumento do período de vigília e a sensação de medo (BRAGA, 2010).

Já na esfera fisiológica, todo o desencadeamento de sintomas é mediado principalmente pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que por sua vez leva a ativação do sistema nervoso simpático e parassimpático. Uma vez ativados, estes sistemas podem condicionar alterações sintomáticas, *e.g.* a palidez, a tensão muscular, o tremor, a tontura e as desordens intestinais (BRAGA, 2010; GRAEFF, 1970).

Os mecanismos neurobiológicos da ansiedade patológica envolvem dois sistemas cerebrais: o sistema cerebral de defesa (SCD); e o sistema de inibição comportamental (SIC) (BRAGA, 2010). O SCD é constituído pela amígdala, o hipotálamo medial e a matéria cinzenta periaquedutal. O SCD tem como objetivo preparar o organismo para situações de enfrentamento, onde há necessidade de mobilização de fontes de energia que favoreçam a luta e fuga. Já o SIC atua principalmente através do sistema septo-hipocampal que está associado às situações de frustrações ou estímulos ameaçadores e terá como resposta a inibição de qualquer movimento que esteja sendo realizado (GRAEFF, HETEM, 2004 apud BRAGA, 2010).

A ansiedade patológica tem sido alvo de estudos há muito tempo e, no decorrer deste período, vários pesquisadores a descreveram de diferentes formas. Em 1880, o neurologista George Miller Beard publicou vários trabalhos sobre “neurastenia”, que se refere a vários problemas psicossomáticos e entre estes a ansiedade já estava presente (GRAEFF, 1970; STARKSTEIN, 2018). Mais adiante, outro termo foi sugerido por médicos que já verificavam um aumento significativo no número de pessoas que tinham como sintoma comum o nervosismo associado a uma variedade de medos *e.g.* medo de doenças, medo de guerra iminente ou medo de ficar desempregado. Nesse período a ansiedade patológica foi caracterizada como neurose e, posteriormente foi denominada como síndrome da neurose da angústia por Freud (STARKSTEIN, 2018).

O termo neurose da angústia foi utilizado até 1980 quando foi publicado o Segundo Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM-II) da Associação Psiquiátrica Americana, onde já se diferenciava a neurose crônica, hoje classificada como transtorno de ansiedade generalizada (TAG), dos ataques de ansiedade, que atualmente se refere ao transtorno de pânico (TP). Desde então, novas versões do DSM estratificaram e definiram melhor os diferentes transtornos de ansiedade (GRAEFF, 1970).

Na versão mais atual do manual, o DSM-V (2013), os transtornos de ansiedade foram reorganizados de forma que alguns, antes considerados como transtornos de ansiedade, foram

realocados em capítulos próprios, *e.g.*, o Transtorno Obsessivo Compulsivo, o Transtorno de Estresse Agudo e o Transtorno de Estresse Pós-Traumático. Além disso, outros transtornos foram inseridos no grupo dos transtornos de ansiedade, *e.g.*, o transtorno de ansiedade de separação e o mutismo seletivo (Quadro 1) (ARAÚJO; NETO, 2014).

Quadro 1. Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V)

Distúrbios de ansiedade	Características principais	Público mais acometido
Transtorno de ansiedade de separação	Apreensão e ansiedade frente à separação de figuras de apego emocional	- Criança com menos de 12 anos; - População feminina;
Mutismo seletivo	Fracasso persistente para falar em público.	- Crianças, independente de sexo ou etnia;
Fobias específicas	Medo, ansiedade ou esquiva instantaneamente induzida pela situação fóbica de forma desproporcional.	- Jovens entre 13 e 17 anos; - População feminina;
Transtorno de ansiedade social (fobia social)	Temor, ansiedade ou esquiva de interações e situações sociais em que o indivíduo possa ser avaliado.	- Todas as faixas etárias; - População feminina;
Transtornos de pânico	Surto abrupto de medo intenso durante o qual ocorrem sintomas físicos e/ou cognitivos.	- A partir dos 14 anos de idade; - População feminina;
Agorafobia	Apreensão e ansiedade em situações que despertem pensamentos de que pode ser difícil escapar.	- Adolescentes e adultos; População feminina;
Transtorno de ansiedade generalizada	Ansiedade e preocupação persistentes e excessivas em relação a várias situações cotidianas.	- Adultos; - População feminina;
Transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento	Ansiedade decorrente de intoxicação ou abstinência de substância ou medicamento	- Sem população específica aparente
Transtorno de ansiedade devido à outra condição médica	Ansiedade decorrente de consequências fisiológicas por alguma condição médica.	Indivíduos acometidos por patologias com asma, hipertensão, úlcera e artrite.

Fonte: Autora, 2019

Segundo o DSM-V, os transtornos de ansiedade se diferenciam entre si de acordo com o tipo de objeto ou situação que desencadeia o medo, a ansiedade e o comportamento de esquiva assim como, na concepção cognitiva que esteja associada. Além disso, estes transtornos podem ser diferenciados do medo e da ansiedade normal por apresentarem reações excessivas e persistentes. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

2.3. EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A ansiedade patológica é considerada um problema de saúde pública em decorrência da elevada prevalência em níveis globais. A preocupação em relação à ansiedade ocorre devido a sua interferência direta no desempenho de atividades cotidianas. Essa interferência reflete diretamente na economia do país tanto em termos de decréscimo produtivo de indivíduos acometidos com ansiedade, como nos gastos com assistência à saúde (CAMPOS et al., 2013; PIERRE-MARIE, 2009). A maioria dos transtornos de ansiedade tende a surgir ainda na infância e, uma vez não tratados, persistem ao longo da vida. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Segundo dados da OMS (2017), em 2015 aproximadamente 3,6% da população mundial apresentava algum transtorno de ansiedade. Nesse estudo o Brasil apresentou uma prevalência de 9,3% da população com algum transtorno de ansiedade, sendo o país com maior prevalência de distúrbios de ansiedade no mundo, seguido do Paraguai, com 7,6%. Segundo esse mesmo estudo, a população mais atingida com a ansiedade é a população feminina com aproximadamente (4,6%) em comparação aos homens (2,6%). Esta diferença é ainda mais pronunciada na região das Américas, onde a prevalência de ansiedade entre a população feminina e masculina é de 7,7% e 3,6%, respectivamente (WHO, 2017).

Além de mais prevalentes entre as mulheres, os transtornos de ansiedade tendem a apresentar maior gravidade dos sintomas neste grupo. Alguns estudos relatam que essa condição pode estar associada a diferenças na posição socioeconômica entre homens e mulheres. No entanto existe uma crescente observação do papel de fatores endógenos no desencadeamento da ansiedade bem como na gravidade dos sintomas (LI; GRAHAM, 2017; MCLEAN ET AL., 2011).

Entre os fatores endógenos que podem favorecer a maior gravidade da ansiedade nas mulheres estão os hormônios sexuais, uma vez que a flutuação desses hormônios durante todo o ciclo menstrual pode favorecer a incidência e gravidade dos sintomas. Esses hormônios podem atuar por meio da modulação da atividade de outros neurotransmissores diretamente ligados a ansiedade, *e.g.*, a serotonina e a alopregnanolona (LI; GRAHAM, 2017).

A serotonina tem ação positiva no controle da ansiedade visto que os fármacos de primeira escolha para o tratamento da ansiedade generalizada, por exemplo, são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (BRAGA, 2010). Já a alopregnanolona teria ação de modulação alostérica do receptor GABA_A, bem como na modulação negativa do eixo HPA (LI; GRAHAM, 2017). Desse modo, os hormônios sexuais, principalmente o estradiol e a progesterona, atuariam inibindo a ação da monoaminoxidase do tipo A (MAO-A) que seriam responsáveis pela degradação da serotonina. Em relação à alopregnanolona a progesterona estaria diretamente ligada a sua síntese, ou seja, a flutuação hormonal que ocorre durante todo o ciclo menstrual favorece a maior incidência de ansiedade no sexo feminino (LI; GRAHAM, 2017).

A diferença entre a resposta a ansiedade também é perceptível no estudo de novas substâncias com potencial efeito ansiolítico, onde embora a prevalência da ansiedade seja maior em mulheres, a maioria dos estudos pré-clínicos de novos ansiolíticos utilizam camundongos machos com maior frequência. Isso se dá pelos motivos acima relacionados sobre a influência da flutuação hormonal em mulheres e, conseqüentemente em fêmeas, assim como pelo fato de que pode haver diferenças na metabolização de determinadas substâncias entre machos e fêmeas (GRIEBEL; HOLMES, 2013).

2.4. MODELOS ANIMAIS PARA ANSIEDADE

Os modelos animais para o estudo dos transtornos psiquiátricos são utilizados com o intuito de mimetizar em laboratório as características observadas nesses transtornos. Esses modelos permitem promover uma correlação entre alterações fisiológicas e comportamentais que estejam associadas ao transtorno em estudo, a etiologia do mesmo, bem como a possível resposta farmacológica (CAMPOS et al., 2013). Apesar dos modelos animais tentarem reproduzir ao máximo os fenômenos apresentados nos transtornos, é impossível que, levando em consideração a vasta diferença cognitiva entre homens e animais de laboratório, toda

amplitude seja alcançada (CAMPOS et al., 2013; GRIEBEL; HOLMES, 2013; RODGERS et al., 1997).

Em relação à ansiedade, as espécies animais mais utilizados nos modelos são os roedores - ratos e camundongos (GRIEBEL; HOLMES, 2013). Existe uma variedade de modelos animais disponíveis para o estudo dos transtornos de ansiedade que vão atuar com finalidades diferentes na investigação da neurobiologia destes transtornos. Alguns modelos visam à avaliação das manifestações físicas e endógenas promovidas pelo estresse, *e.g.* a hipertermia e a dosagem de corticosterona, respectivamente. No entanto, a maioria dos modelos animais para ansiedade é baseada na análise comportamental de animais expostos a situações que mimetizem a ansiedade humana (RODGERS et al., 1997; STEIMER, 2011).

O comportamento semelhante à ansiedade nos modelos animais pode ser baseado na resposta condicionada ou não condicionada a diferentes estímulos. Os modelos que promovem respostas condicionadas são realizados por meio da privação de água, comida ou pelo uso de choque elétrico e, por mais que garantam melhor controle sobre a condição experimental, exigem mais tempo para treinamento e condicionamento dos animais. Já os testes baseados na resposta espontânea (não condicionada) analisam o comportamento do animal frente a situações de conflitos entre exploração de novas áreas ao mesmo tempo em que os animais tendem a se esquivar de ameaças em potencial (GRIEBEL; HOLMES, 2013; RODGERS et al., 1997).

Os modelos baseados na resposta não condicionada garantem maior validade etológica, além de proporcionarem maiores detalhes na caracterização das mudanças comportamentais que induzem. O primeiro modelo baseado nessas características foi o labirinto em Y que possuía um braço fechado e dois braços abertos, onde foi possível observar que o animal tinha maior preferência pelo braço fechado, caracterizando o maior nível de medo e esquiva proporcionado pelos braços abertos, uma vez que todo o aparato atuaria como um ambiente novo para o animal (CAMPOS et al., 2013).

Dentre os modelos validados para avaliar o comportamento do tipo ansioso do animal, o labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa claro-escuro (CCE) são os mais utilizados. No entanto, embora esses testes apresentem uma grande similaridade entre as variáveis analisadas divergem quanto à situação aversiva que o animal é exposto. Enquanto no LCE o ambiente aversivo consiste nos braços abertos e elevados, na CCE a situação aversiva consiste num compartimento claro. O campo aberto (CA) por sua vez, embora tenha sido utilizado para

avaliação do comportamento do tipo ansioso, apresenta bastante divergência tanto em relação aos dois testes antes mencionados, quanto em relação à obtenção de resultados variáveis com substâncias ansiolíticas já conhecidas (RAMOS, 2008).

A validação tanto de novos modelos animais para ansiedade quanto farmacológica, geralmente são feitas utilizando os benzodiazepínicos como fármaco ansiolítico padrão (CAMPOS et al., 2013; GRIEBEL; HOLMES, 2013). No entanto, em relação à abordagem farmacológica, os benzodiazepínicos respondem melhor a substâncias que atuem por mecanismo semelhante a esses fármacos. Por isso, pode acontecer a falsa insensibilidade de outros fármacos a alguns testes animais, *e.g.*, a buspirona, um agonista parcial da serotonina que apresenta eficácia clínica no tratamento de ansiedade, mas não responde positivamente aos modelos convencionais como os benzodiazepínicos (RODGERS et al., 1997).

2.5. TRATAMENTO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Embora a ansiedade patológica seja considerada um dos principais problemas de saúde pública e atinja um número considerável de pessoas em todo mundo, a busca pelo tratamento nem sempre ocorre. Muitas vezes, a ausência da procura por tratamento está associada ao grau de interferência que cada transtorno pode ocasionar, *e.g.*, indivíduos com fobias específicas tendem a conviver com o problema por não conseguirem associar o medo excessivo ao transtorno (BANDELOW et al., 2017). Situação demonstrada em um estudo realizado nos Estados Unidos que verificou uma busca maior por tratamento de pessoas que apresentavam transtorno de pânico (54,4%) em comparação a pessoas que apresentavam fobias específicas (23,7%) (REGIER et al., 1993).

O tratamento da ansiedade patológica pode incluir psicoterapia, farmacoterapia e outras áreas que devem ser escolhidas de acordo com o quadro específico do paciente (BANDELOW et al., 2017). No entanto, alguns dados demonstram que mesmo quando o diagnóstico do transtorno de ansiedade é estabelecido, nem sempre ocorre acompanhamento terapêutico adequado, seja pela falta de disponibilidade de tratamento, ou pela ausência da psicoterapia e/ou farmacoterapia (BANDELOW et al., 2017).

2.5.1. Farmacoterapia disponível para os transtornos de ansiedade

Em relação à farmacoterapia, a maioria dos tratamentos disponíveis é direcionada aos transtornos de ansiedade generalizada (TAG), de ansiedade social (TAS) e de pânico (TP), não havendo ainda tratamentos específicos para os demais transtornos (BANDELOW et al., 2017; GRIEBEL; HOLMES, 2013). O tratamento farmacológico para estes transtornos de ansiedade inclui uma variedade de fármacos pertencentes a diferentes classes dentre as quais os inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS), os inibidores da recaptação de noradrenalina e serotonina (IRNS), os benzodiazepínicos (BZDs) e os antidepressivos tricíclicos (BRAGA, 2010; GRAEFF, 1970).

Os ISRS são considerados fármacos de primeira escolha no tratamento da ansiedade devido a menor incidência de efeitos adversos, associado a melhor eficácia no tratamento dos efeitos psicológicos e emocionais da ansiedade quando comparado aos tratamentos mais convencionais com benzodiazepínicos ou antidepressivos tricíclicos. Embora a eficácia clínica dos ISRSs tenha sido observada, os mecanismos pelos quais esses fármacos atuam na ansiedade ainda não se encontram totalmente elucidados. Estudos demonstram que o aumento da concentração de serotonina após dessensibilização dos receptores 5HT₁ pode estar envolvido no efeito ansiolítico dos ISRS (KENT; COPLAN; GORMAN, 1998).

O tempo de dessensibilização dos receptores 5HT₁ pode estar relacionado com a latência para início dos efeitos ansiolíticos desses fármacos. Esse retardo inicial para ação desejada e a exacerbação dos sintomas da ansiedade no início do tratamento são os efeitos indesejados mais relacionados ao uso dos ISRSs. Além desses efeitos, fadiga, aumento ou diminuição do apetite, tremor, sudorese, disfunção sexual, diarreia, constipação e outros efeitos colaterais podem ser ocasionados pelo uso desses fármacos (BANDELOW et al., 2017; KENT; COPLAN; GORMAN, 1998).

Os antidepressivos tricíclicos apresentam efeito ansiolítico no tratamento de transtornos, *e.g.*, o transtorno de pânico e o transtorno de ansiedade generalizada. No entanto, a gravidade dos efeitos adversos associados ao seu uso é maior que a dos ISRS, *e.g.* efeitos anticolinérgicos, sonolência, tontura, efeitos colaterais cardiovasculares, ganho de peso, náusea, dor de cabeça, disfunção sexual e outros efeitos colaterais (ARIKIAN; GORMAN, 2001; BANDELOW et al., 2017; BRAGA, 2010).

Nos últimos anos o uso dos BZDs no tratamento dos transtornos de ansiedade tem diminuído, mas mesmo assim é a classe farmacológica mais utilizada atualmente. Sua

preferência está relacionada à rapidez para início do efeito ansiolítico, seja por administração oral ou parenteral, diferente das classes acima mencionadas (ARIKIAN; GORMAN, 2001; SHADER; GREENBLATT, 1993). A ação rápida dos BZDs se deve a características estruturais que garantem maior lipossolubilidade, favorecendo uma rápida absorção pelo trato gastrointestinal e maior facilidade de passagem através da barreira hemato-encefálica (BHE) (GRAEFF, 1970).

O mecanismo de ação dos BZDs é bastante conhecido, sua atividade se dá por ligação a um sítio específico presente no receptor GABA_A. A ligação dos benzodiazepínicos nesse sítio promove uma alteração conformacional no receptor que permite maior interação entre o receptor e o neurotransmissor inibitório ácido gama aminobutírico (GABA) (GRAEFF, 1970). Esta interação leva à abertura do canal de cloro, que permite o influxo de cloreto para o interior da célula, o que leva a hiperpolarização e consequentemente, uma resposta inibitória (BRAGA, 2010; CASTILLO et al., 2000; GRAEFF, 1970; OLSEN, 1981).

Embora os BZDs possuam a vantagem de apresentar início rápido no tratamento da ansiedade patológica, vários efeitos adversos estão associados ao seu uso. Dentre os efeitos adversos estão a sedação, a confusão mental, a amnésia e a tolerância; tais efeitos limitam o uso desses fármacos visto que interferem diretamente na realização de atividades cotidianas. Além disso, a interação dos BZDs com outras substâncias inibitórias do sistema nervoso podem levar a quadros mais graves, *e.g.* depressão do sistema respiratório (ARIKIAN; GORMAN, 2001; BANDELOW et al., 2017; LOCKE; KIRST; SHULTZ, 2015).

Os quadros mais graves de intoxicação por BZDs são tratados com medidas farmacológicas que incluem a administração de um antagonista competitivo do sítio de ligação dos BZDs, o flumazenil. Esse antagonista possui estrutura química semelhante aos BZDs, sendo capaz de se ligar ao seu sítio de ação, no entanto não promove nenhuma atividade oriunda de sua ligação (GRAEFF, 1970). Essa atividade antagonista do flumazenil tem sido utilizada em ensaios farmacológicos com o intuito de verificar se o mecanismo de ação de novas substâncias ansiolíticas é semelhante ao mecanismo dos BZDs (GIRISH et al., 2013; MANSOURI et al., 2013).

2.5.2. Novas alternativas farmacológicas para os transtornos de ansiedade

A busca por novas opções farmacológicas para o tratamento dos transtornos de ansiedade é baseada na alta incidência de efeitos adversos associados aos tratamentos atualmente disponíveis. Além disso, existem indivíduos que não respondem de maneira

satisfatória a nenhum desses fármacos, o que contribui de maneira significativa para a investigação de novas opções, como também, no melhor entendimento das bases neurobiológicas dos transtornos de ansiedade (MURROUGH et al., 2016; WITTMANN et al., 2009).

- **Plantas medicinais no tratamento da ansiedade**

Embora o uso de plantas medicinais seja bastante antigo, a utilização dessa alternativa foi por muito tempo baseada apenas em conhecimento empírico. No entanto, existe uma crescente investigação da veracidade dos efeitos ansiolíticos de diversas plantas utilizadas pela população em geral. O conhecimento empírico é a base das pesquisas científicas que envolvem também a investigação fitoquímica e os estudos farmacológicos (FAJEMIROYE et al., 2016).

Algumas plantas já apresentam mecanismos de ação identificados, dentre os quais estão a modulação gabaérgica, a modulação do eixo HPA ou a inibição da receptação de serotonina (SAKI; BAHMANI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Outras plantas apresentam eficácia reconhecida em ensaios clínicos, *e.g.*, a *Piper methysticum* (kava-kava), a *Passiflora incarnata* e a *Valeriana officinalis* (FAUSTINO; ALMEIDA; ANDREATINI, 2010). Outros estudos identificaram alguns componentes fitoquímicos que podem estar associado ao efeito ansiolítico, a exemplo das saponinas, dos óleos essenciais e dos flavonoides (GUZMÁN; REYES; BONILLA, 2014).

A utilização de plantas medicinais também exige semelhante cautela aos fármacos atualmente disponíveis, embora grande parte da população acredite que por se tratar de um medicamento natural não existem riscos à saúde associados ao seu uso. A análise toxicológica de algumas plantas com efeito ansiolítico tem demonstrado que muitas destas apresentam efeitos adversos importantes, *e.g.*, a hepatotoxicidade, a interação negativa com outras substâncias, as reações alérgicas e a dependência (FAJEMIROYE et al., 2016).

- **Investigação da ação de peptídeos no tratamento da ansiedade**

Os peptídeos ganharam destaque na busca por novas opções terapêuticas, não só em relação aos transtornos de ansiedade como de depressão, por meio da observação do envolvimento de neuropeptídios no desencadeamento dos sintomas relacionados com os transtornos mentais. A atuação dos neuropeptídios está relacionada ao eixo HPA. A ativação

deste eixo induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do cortisol, sendo o ACTH liberado mediante ação do hormônio corticotropina (CRH) (MURROUGH et al., 2016; WITTMANN et al., 2009).

Estudos demonstraram que a CRH em altas concentrações produz efeitos do tipo ansiogênico em camundongos, bem como o bloqueio dos receptores de CRH produz efeitos contrários (SMITH et al., 1998; STENZEL-POORE et al., 1996). Outros peptídeos. *e.g.*, os peptídeos intestinais, por mecanismos ainda não esclarecidos, podem ter papel fundamental na regulação do eixo cérebro-intestino promovendo alterações que levem ao desenvolvimento dos transtornos de ansiedade e depressão. Um exemplo é o neuropeptídio Y (NPY) que atuaria contrabalanceando os efeitos do CRH (LACH et al., 2018; MURROUGH et al., 2016).

Mediante a essa participação da sinalização e regulação do eixo HPA, os peptídeos tem sido alvo para descobertas de novos fármacos ansiolíticos, seja por antagonizar o CRH ou substâncias que mimetizem o NPY. Estudos pré-clínicos com peptídeos tem demonstrado efeitos positivos em relação à ansiedade e a neuroquímica cerebral, no entanto ainda não foi possível a reprodução dos resultados em testes clínicos (MURROUGH et al., 2016; WITTMANN et al., 2009).

- **Complexos metálicos como alternativa para o tratamento da ansiedade**

A química inorgânica tem sido bastante utilizada como ferramenta no desenvolvimentos de novos fármacos. O grande destaque para essa técnica tem sido a sua utilização para síntese de fármacos com efeitos na terapia do câncer, a exemplo da cisplatina que é um antitumoral a base de platina, bastante utilizado no tratamento de diversos tipos de neoplasias (ROCHA et al., 2011). Além dos antineoplásicos, fármacos antiartríticos utilizam o ouro como metal de coordenação, o nitroprussiato de sódio para tratamento de problemas cardiovasculares, e vários antimicrobianos que foram modificados utilizando a técnica de coordenação por metal (FERLE, 2013; MJOS; ORVIG, 2014).

Em relação aos distúrbios psicológicos, o sais de lítio, utilizados no tratamento do transtorno bipolar, são os complexos metálicos mais conhecidos (MJOS; ORVIG, 2014). A utilização dos complexos metálicos na síntese de fármacos voltados aos transtornos psicológicos é bem limitada e, além dos sais de lítio, apenas a investigação da atividade anticonvulsivante em camundongos foi descrita recentemente utilizando complexos organometálicos derivados do diazepam (BARROS et al., 2016). Resultados, não publicados,

obtidos pelo nosso grupo demonstraram o efeito do tipo ansiolítico de um complexo metálico derivado do bromazepam [(BMZPdCl₂)] (0,15µg/Kg).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar os efeitos do complexos metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂]₂ nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e memória em camundongos *Swiss* fêmeas.

3.2. Específicos

- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos *Swiss* fêmeas submetidos aos testes de ansiedade: teste do labirinto em cruz elevado e teste da caixa claro-escuro;
- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) na atividade locomotora espontânea de camundongos *Swiss* fêmeas submetidos ao teste do campo aberto;
- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) nos parâmetros relacionados com memória em camundongos *Swiss* fêmeas submetidos ao teste do step-down;
- Avaliar se o efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂]₂ em camundongos *Swiss* fêmeas ocorre via receptores GABA_A, através do pré-tratamento com flumazenil [2 mg/Kg, i.p.; antagonista competitivo do sítio BZD do receptor GABA_A].

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

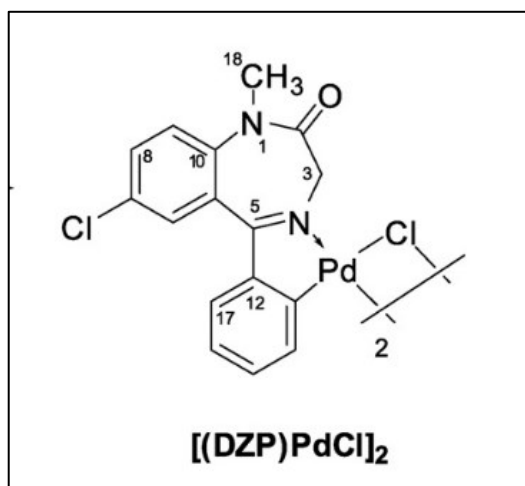
Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas adultos (aproximadamente 35 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL). Os animais foram mantidos durante o período experimental no biotério setorial do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL) com temperatura e umidade controladas (21 ± 2 °C). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (10 animais/gaiola) e foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 h (7 h início do período claro), com água e ração *ad libitum*. Antes de cada experimento, os animais permaneceram por no mínimo 1h no interior da sala de experimentação para ambientação. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL, Protocolos nº 29/2018 (ANEXO 1).

4.2. Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções para o tratamento dos animais:

- Complexo metálico [(DZP)PdCl]₂ (Figura 1), gentilmente cedido pelo Prof. Dr Mário Meneghetti do Grupo de Catálise e Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (GCaR – UFAL);
- Solução veículo composta por solução salina (NaCl 0,9%) mais Tween 80 0,5% para diluição das substâncias e tratamento dos animais do grupo controle negativo;
- Flumazenil (2mg/Kg).

Figura 1. Estrutura química do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂



Fonte: (BARROS et al., 2016)

4.3. Determinação do ciclo estral

Os camundongos *Swiss* fêmeas foram imobilizados cuidadosamente para a realização da coleta do lavado vaginal com o intuito de verificar a etapa do ciclo estral. Para cada animal foi realizado o esfregaço vaginal em duplicata, que foi corado com o kit para coloração rápida em hematologia (Instant Prov). Após coradas, as lâminas foram analisadas em microscópio biológico binocular (Bioval, L-1000B) no aumento de 10x. Os testes comportamentais com camundongos fêmeas devem ser realizados durante a fase diestro do ciclo estral para evitar a influência de variações hormonais no comportamento do tipo ansioso dos animais (LI et al., 2018).

4.4. Testes comportamentais utilizados

4.4.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

O LCE é um dos testes etologicamente fundamentados, baseado nas respostas inatas de medo/ansiedade de diferentes espécies animais diante de situações naturalmente aversivas, enfatizando padrões relativamente estáveis de comportamento que são herdados para garantir a reprodução e a sobrevivência de cada espécie. Os parâmetros etológicos avaliados no LCE têm grande utilidade no estudo de drogas ansiolíticas/ansiogências e serão utilizados neste trabalho, associados aos parâmetros clássicos (espaço-temporais), para aumentar a sensibilidade do método, como proposto por Rodgers e Cole (1994). O LCE (Insight®, Brasil) é confeccionado em acrílico e consiste de dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) e dois abertos (30 x 5 cm), opostos em forma de cruz e elevados a 38,5 cm do nível do chão. Os braços abertos possuem barras laterais de 0,25 cm de altura para evitar a queda do animal (Figura 2). Ao final do experimento, o LCE foi limpo com álcool a 10%.

Figura 2. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).

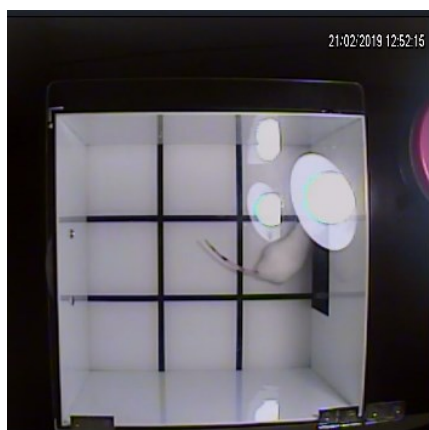


Fonte: Registro do programa Intelbras media player (LNFI/UFAL)

4.4.2. Teste da caixa claro-escuro (CCE)

A CCE permite avaliar a aversão inata que os roedores possuem por áreas iluminadas. A CCE consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos (claro e escuro) separados por uma divisória com abertura para o movimento transitório do animal (Figura 3). O número de entradas e o tempo gasto pelo animal no compartimento claro são os parâmetros indicativos da atividade ansiolítica frequentemente analisados (TAKAO e MIYAKAWA, 2006). Ao final do experimento, a CCE foi limpa com álcool a 10%.

Figura 3. Teste da caixa claro-escuro (CCE) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).



Fonte: Registro do programa Intelbras media player (LNFI/UFAL)

4.4.3. Teste do campo aberto (CA)

O CA (Insight®, Brasil) consiste de uma arena circular de acrílico (30 cm de altura e 30cm de diâmetro), com o piso dividido em doze partes que permite avaliar a atividade locomotora espontânea (Figura 4). Uma redução no número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo e controle, pode ser interpretada como prejuízo na atividade locomotora espontânea. Por outro lado, um aumento nesse parâmetro pode ser interpretado como melhora no desempenho motor (PRUT e BELZUNG, 2003). Ao final do experimento, o CA foi limpo com álcool a 10%.

Figura 4. Teste do campo aberto (TCA) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).



Fonte: Registro do programa Intelbras media player (LNFI/UFAL)

4.4.4. Step-down (SD)

O SD permite avaliar a esquiva passiva e respostas referentes ao aprendizado e/ou memória dos animais (KAMEYAMA et al., 1986). O aparato foi constituído em alumínio com o assoalho constituído de barras de aço ligado a um gerador de corrente elétrica de 127/220 V e com uma área de fuga de 260 mm x 100 mm (plataforma, Figura 5). Os animais, quando descem para o assoalho de aço, levam um choque de intensidade baixa. Posteriormente, são inseridos novamente no aparato e uma redução no tempo de latência de descida para o assoalho pode ser interpretada como prejuízo da memória.

Figura 5. Teste do step-down (SD) do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL).



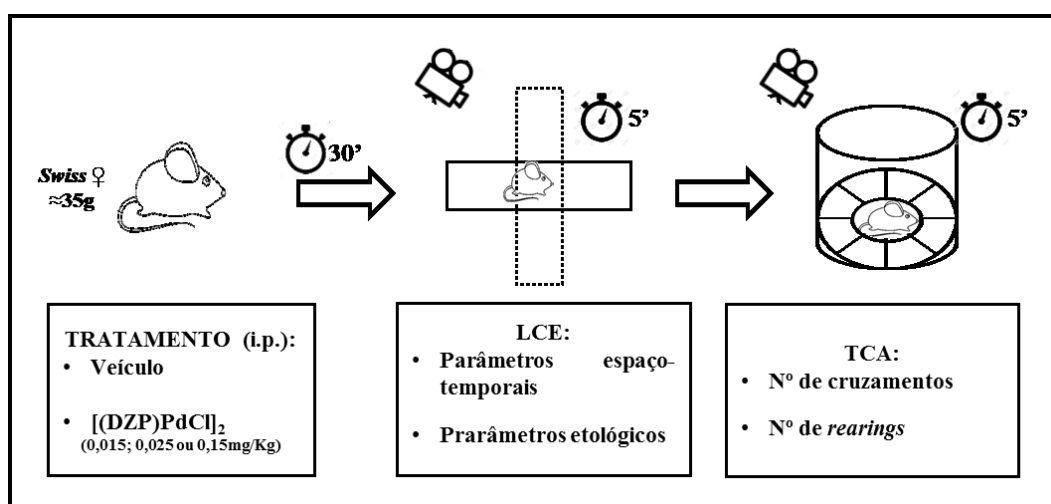
Fonte: Registro do programa Intelbras media player (LNFI/UFAL)

4.5. Delineamento experimental

4.5.1. Experimento 1 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivados do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado

Os animais foram tratados (i.p.) com: veículo (NaCl 0,9% + 0,5% Tween 80; grupo controle) ou complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg). Passados 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao LCE. No LCE, os animais foram colocados na plataforma central do aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e o seu comportamento foi avaliado durante 5 min para registro das seguintes medidas comportamentais: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados (considera-se a entrada em um dos braços quando a maior parte do corpo do animal está dentro do respectivo braço), medidas etológicas de avaliação de risco tais como imersões de cabeça desprotegidas (unprotected head-dipping), estiramentos corporais protegidos (protected stretch-attend postures) e comportamento de levantar (rearing) (Figura 6).

Figura 6. Delineamento experimental realizado para avaliar a atividade do tipo ansiolítica no LCE e a atividade locomotora no CA do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015; 0,025 ou 0,15 mg/Kg)



LCE = Labirinto em cruz elevado; TCA = Teste do campo aberto; i.p. = administração intraperitoneal. Fonte: AUTORA, 2019

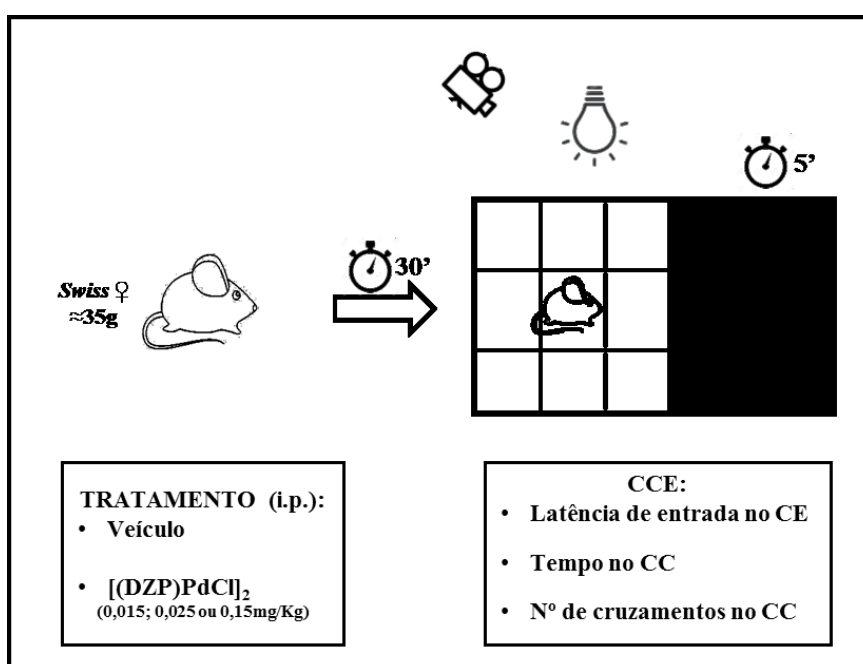
4.5.2. Experimento 2 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) na atividade locomotora espontânea de camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do campo aberto.

Imediatamente após passarem pelo LCE (Experimento 1), cada animal foi submetido individualmente ao CA para avaliação da atividade locomotora espontânea, onde foi registrado o número de cruzamentos e de levantar (*rearing*) de cada animal durante 5 min (Figura 6).

4.4.3. Experimento 3 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste da caixa claro-escuro.

Os animais foram tratados (i.p.) com: veículo (NaCl 0,9% + 0,5% Tween80; grupo controle) ou complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg). Passados 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos a CCE. Cada animal foi colocado individualmente no compartimento claro da caixa e com a cabeça voltada para o compartimento escuro e o seu comportamento foi avaliado durante 5 min através do registro das seguintes medidas comportamentais: tempo de permanência no compartimento claro e número de entradas no compartimento escuro (Figura 7).

Figura 7. Delineamento experimental realizado para avaliar a atividade do tipo ansiolítica na CCE do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015; 0,025 ou 0,15 mg/Kg)

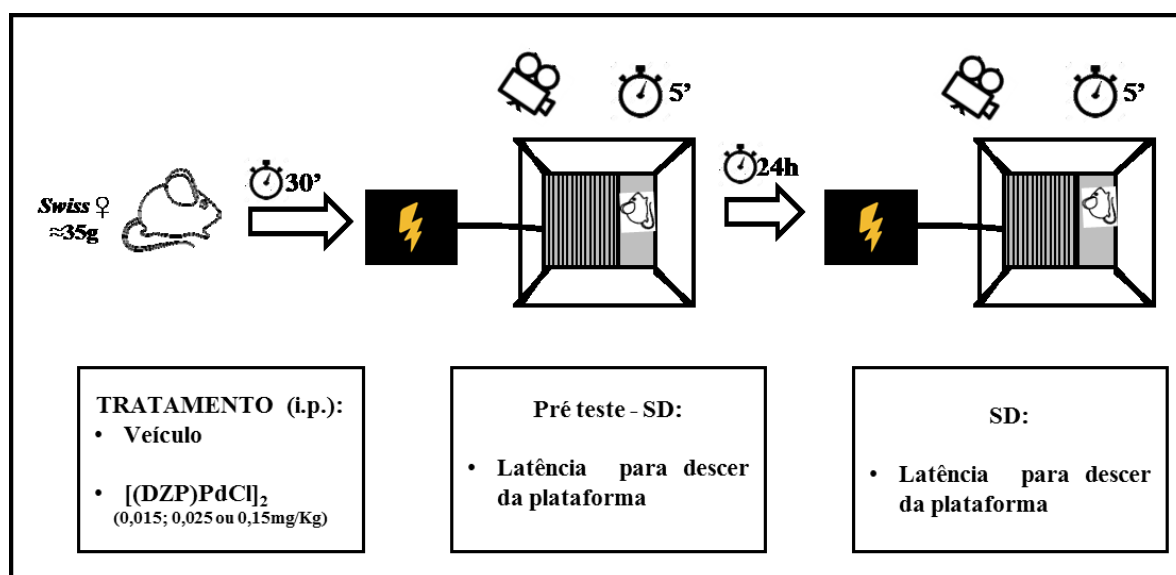


CCE = Caixa claro-escuro; CE = Compartimento escuro; CC = Compartimento claro; i.p. = administração intraperitoneal. Fonte: AUTORA, 2019

4.5.4. Experimento 4 - Avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) do complexo metálico derivados do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg) nos comportamentos relacionados com a memória em camundongos Swiss fêmeas submetidos ao teste do step-down.

Os animais foram tratados (i.p.) com: veículo (NaCl 0,9% +0,5% Tween80; grupo controle) ou complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/kg). Passados 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao SD. Quando o animal desceu para o assolho de barras de ferro recebeu um choque de intensidade de 0,4 mA (sessão do treino, 3s). 24h após o treino, o animal foi novamente inserido no teste (sessão teste) e foi avaliado a latência do animal para descer da plataforma para o assolho de barras de ferro. Na sessão de teste, o animal não levou mais o choque (Figura 8).

Figura 8. Delineamento experimental realizado para avaliar efeito amnésico no SD do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015; 0,025 ou 0,15 mg/Kg)



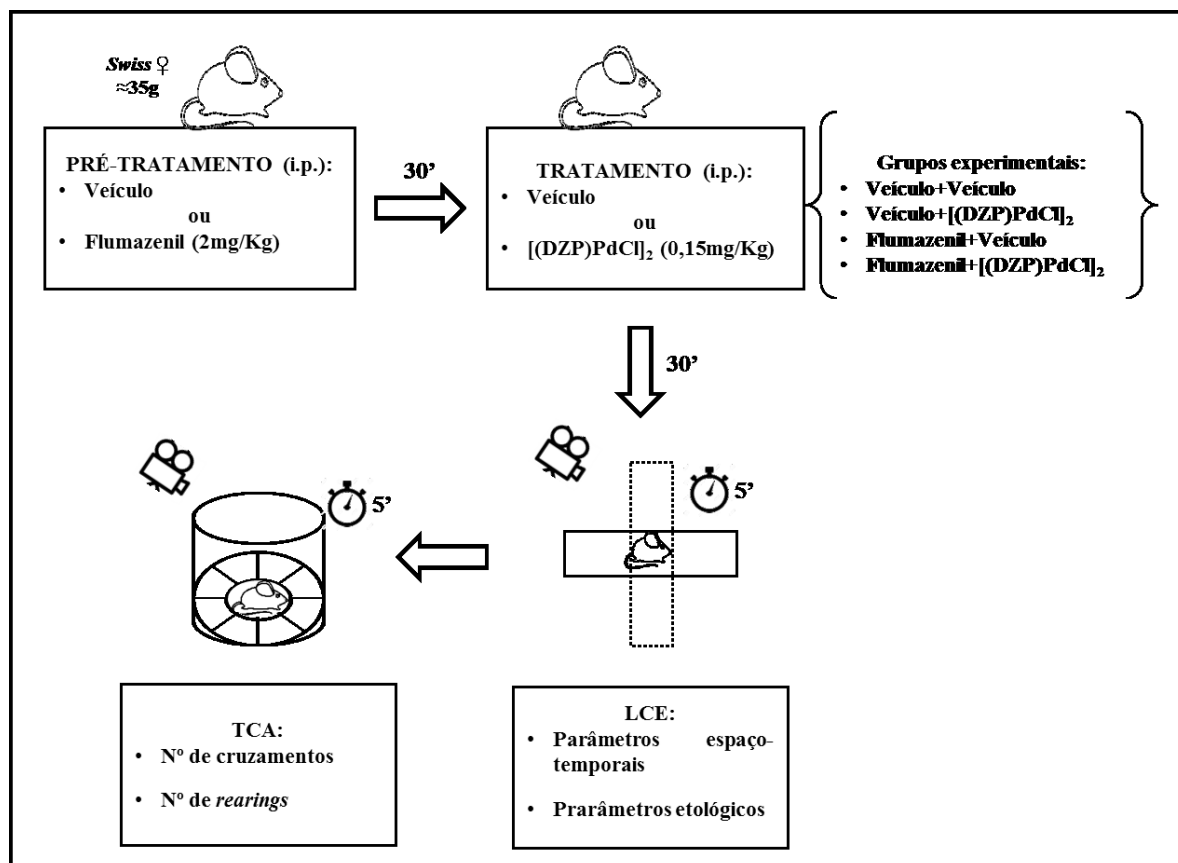
SD = Step-down; i.p. = Administração intraperitoneal. Fonte: AUTORA, 2019

4.5.5. Experimento 5 - Avaliação de se o efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ em camundongos Swiss fêmeas ocorre via receptores GABA(A), através do pré-tratamento com flumazenil [antagonista competitivo do sítio BZD do receptor GABA(A)].

Os animais foram pré-tratados (i.p.) com veículo (NaCl 0,9% + 0,1% Tween 80) ou flumazenil (2 mg/Kg). Passados 30 minutos, os animais foram tratados com veículo ou [(DZP)PdCl]₂ (0,15mg/Kg) formando os seguintes grupos experimentais: Veículo+veículo (Grupo controle); Salina+[(DZP)PdCl]₂; Flumazenil+Salina; e Flumazenil+[(DZP)PdCl]₂.

Após 30 minutos do último tratamento, os animais foram submetidos ao LCE para avaliação dos comportamentos relacionados com medo e ansiedade durante 5 min. Imediatamente após o LCE, os animais foram submetidos ao CA para avaliação da atividade locomotora espontânea (Figura 9).

Figura 9. Delineamento experimental realizado para avaliar possível modulação gabaérgica no efeito tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,15 mg/Kg)



LCE = Labirinto em cruz elevado; TCA = Teste do campo aberto; i.p. = administração intraperitoneal. Fonte: AUTORA, 2019

4.6. Análise estatística

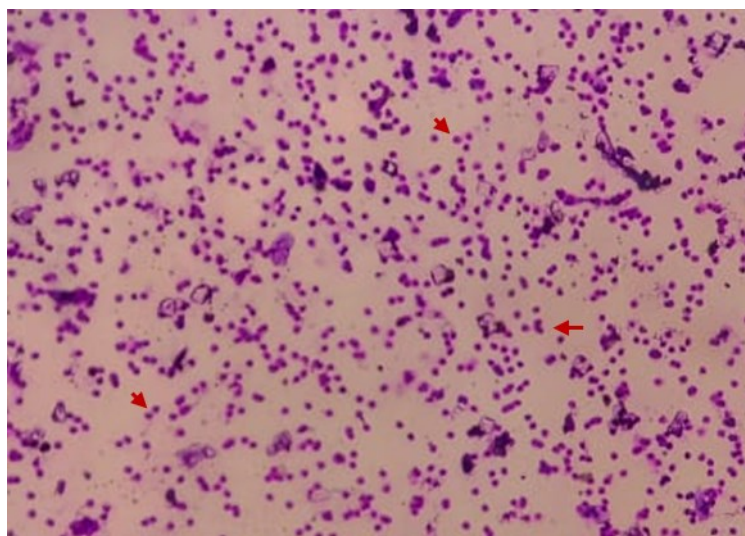
Todos os resultados obtidos foram inicialmente organizados em tabelas no Microsoft Office Excel[®] Version 2010 e posteriormente foram plotados no programa GraphPad Prism[®] Version 5.01 para obtenção dos gráficos. Para a realização das análises estatísticas dos dados, foi utilizado o teste ANOVA One-way, seguido do post-hoc de *Newman keuls*, assumindo um valor de $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Ciclo estral

A fotomicrografia do lavado vaginal dos camundongos demonstrou uma maior concentração de leucócitos no campo analisado, indicativo que os animais se encontravam na fase diestro do ciclo estral (Figura 10).

Figura10. Fotomicrografia de esfregaço vaginal de camundongos *Swiss* fêmeas na fase diestro do ciclo estral



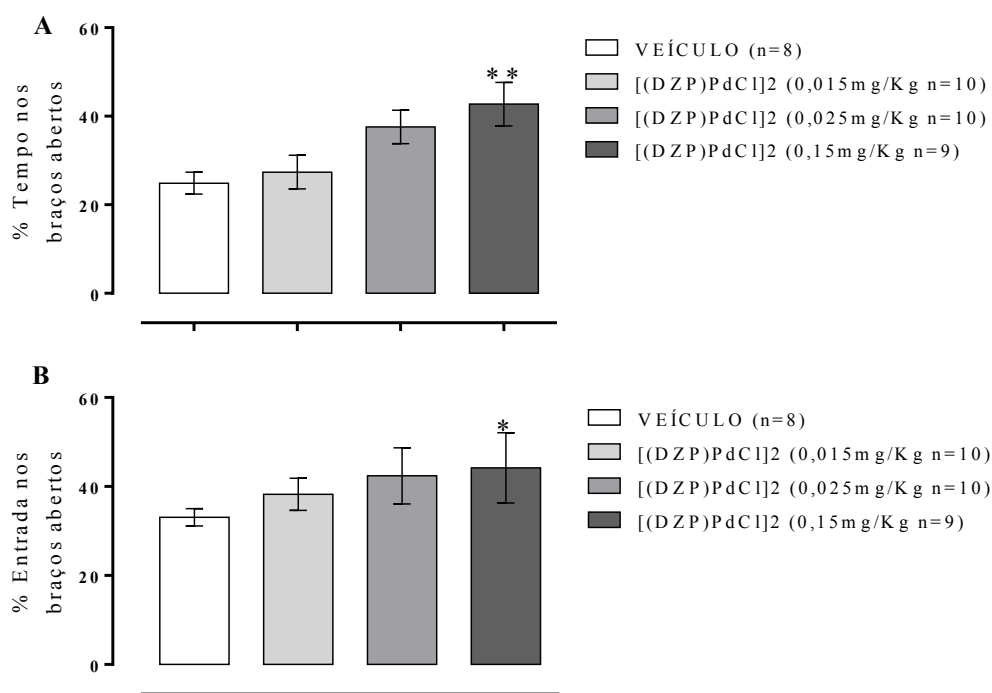
As setas vermelhas indicam os leucócitos encontrados no esfregaço do lavado vaginal (aumento de 10x). Fonte: Autora, 2019.

5.2. Labirinto em cruz elevado (LCE)

A administração do complexo metálico derivado do diazepam $[(DZP)PdCl]_2$ na dose de 0,15mg/Kg, aumentou a porcentagem de tempo nos braços abertos, %TBA, ($F_{3,33} = 4,487$; $P = 0,0095$; Figura 11A) e a porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBA, ($F_{3,33} = 3,057$; $P = 0,0418$; Figura 11B) de maneira significativa quando comparada ao grupo controle (Veículo).

Em relação aos parâmetros etológicos observados no LCE, não houve diferença significativa em relação aos parâmetros observados entre o grupo controle e os grupos das diferentes doses do complexo metálico $[(DZP)PdCl]_2$ [uHD ($F_{3,33} = 1,252$); $P = NS$, pSAP ($F_{3,33} = 2,058$; $P = NS$) e REA ($F_{3,33} = 0,4948$; $P = NS$) Tabela 1]. Não foi detectada diferença significativa em relação ao número de entradas nos braços fechados (EBF) entre as doses do complexo metálico e o grupo controle ($F_{3,33} = 2,394$; $P = NS$; Tabela 1).

Figura 11. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no labirinto em cruz elevado (LCE).



Porcentagem de tempo (A) e de entradas (B) nos braços abertos do LCE. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle (Veículo) (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Tabela 1. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no número de entradas nos braços fechados (EBF) e nos parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

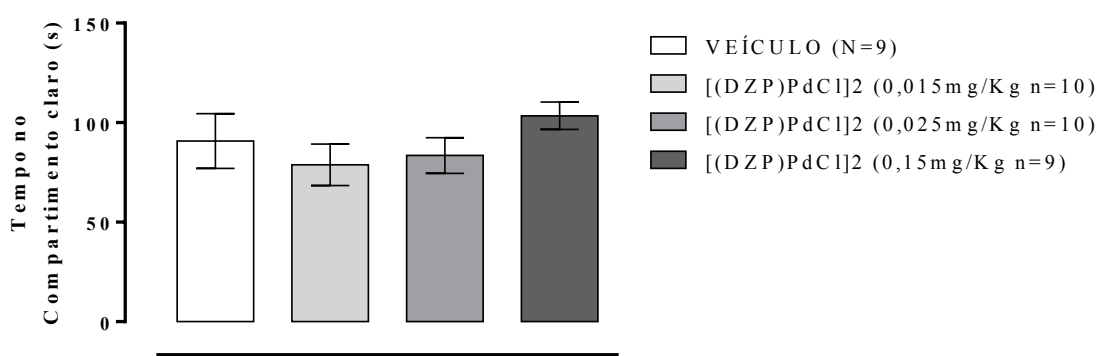
Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados do LCE			
	EBF	uHD	pSAP	REA
Veículo (n=8)	13,0 $\pm$ 1,150	11,63 $\pm$ 1,99	2,62 $\pm$ 0,625	14,50 $\pm$ 1,936
[(DZP)PdCl] ₂ 0,015 (n=10)	10,8 $\pm$ 0,997	7,60 $\pm$ 1,056	1,20 $\pm$ 0,290	11,60 $\pm$ 1,222
[(DZP)PdCl] ₂ 0,025 (n=10)	13 $\pm$ 0,788	9,7 $\pm$ 1,476	1,90 $\pm$ 0,458	13,90 $\pm$ 1,345
[(DZP)PdCl] ₂ 0,15 (n=9)	10,2 $\pm$ 0,812	8,22 $\pm$ 1,730	1,44 $\pm$ 0,294	12,78 $\pm$ 0,702

uHD= *unprotected head-dipping* não protegido, pSAP= *stretch-attend posture* protegido, REA= *rearings*, CRUZ= cruzamentos. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. $P = NS$ (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

8.3. Caixa claro-escuro (CCE)

Na CCE, a ANOVA uma via não detectou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e as diferentes doses do complexo metálico nos parâmetros temporais [TCC ($F_{3,34} = 1,081$; $P = NS$; Figura 12 e LECE [$F_{3,34} = 1,253$, $P = NS$; Tabela 2] e espaciais [nECE ($F_{3,34} = 0,4581$, $P = NS$; Tabela 2] e CRUZ [$F_{3,34} = 2,626$, $P = NS$; Tabela 2].

Figura 12. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no tempo de permanência no compartimento claro no teste da caixa claro-escuro (CCE).



Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. $P=NS$ (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Tabela 2. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE)

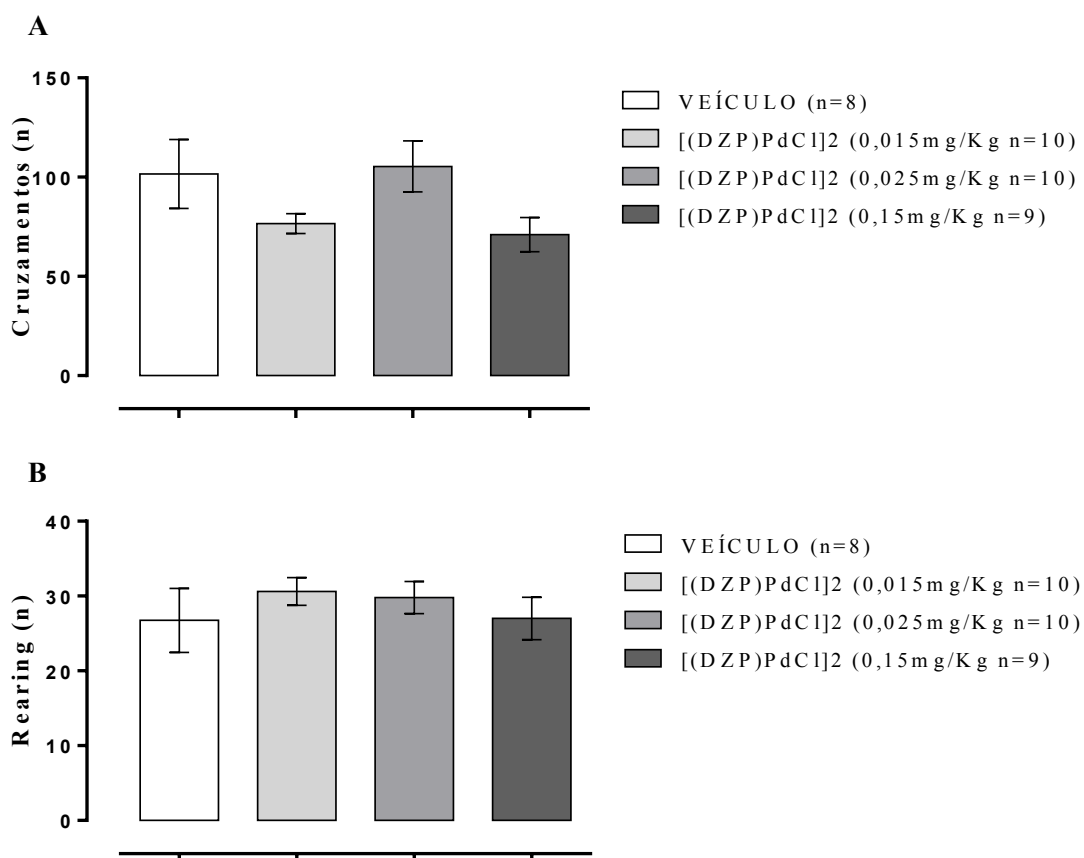
Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros da CCE		
	LECE	nECE	CRUZ
Veículo (n=9)	8,111 $\pm$ 2,003	8,222 $\pm$ 0,9095	27,67 $\pm$ 3,686
[(DZP)PdCl] ₂ 0,015 (n=10)	4,000 $\pm$ 1,193	8,300 $\pm$ 1,023	30,30 $\pm$ 4,551
[(DZP)PdCl] ₂ 0,025 (n=10)	8,500 $\pm$ 1,899	8,000 $\pm$ 0,6498	29,40 $\pm$ 3,691
[(DZP)PdCl] ₂ 0,15 (n=9)	8,111 $\pm$ 2,557	9,222 $\pm$ 0,3239	41,78 $\pm$ 3,307

LECE= latência para entrar no compartimento escuro, nECE= número de entradas no compartimento escuro, CRUZ= cruzamentos totais no compartimento claro. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. $P=NS$ (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

8.4. Teste do campo aberto (CA)

Em relação ao teste do campo aberto (CA), a ANOVA uma via não detectou diferença significativa entre os animais tratados com as diferentes doses do complexo e o grupo controle, tanto em relação ao número de cruzamentos ($F_{3,33} = 2,344$; $P = NS$; Figura 13A) quanto em relação ao número de *rearings* ($F_{3,33} = 0,4948$; $P = NS$; Figura 13B).

Figura 13. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no teste do campo aberto (CA).

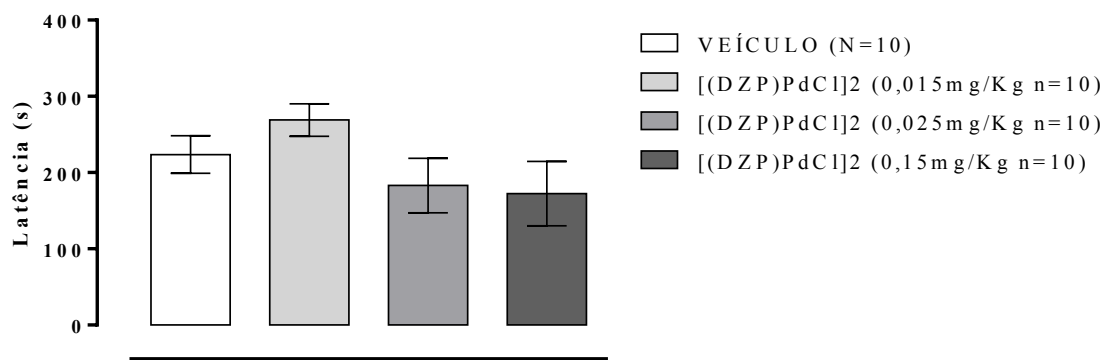


Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. $P=NS$ (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

8.5. Step-down (SD)

No teste do step-down, a ANOVA uma via não detectou diferença significativa entre os grupos que receberam as doses do controle metálico derivado do diazepam e o grupo controle no tempo de latência para descer da plataforma ($F_{3,36} = 1,864$; $P = NS$; Figura 14).

Figura 14. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,015, 0,025 ou 0,15 mg/Kg) no step-down (SD).



Resultados expressos em média ± E.P.M. P=NS (ANOVA uma via seguida do teste de Newman Keuls).

8.6. Modulação gabaérgica do efeito tipo ansiolítico pelo bloqueio com o flumazenil (antagonista dos benzodiazepínicos)

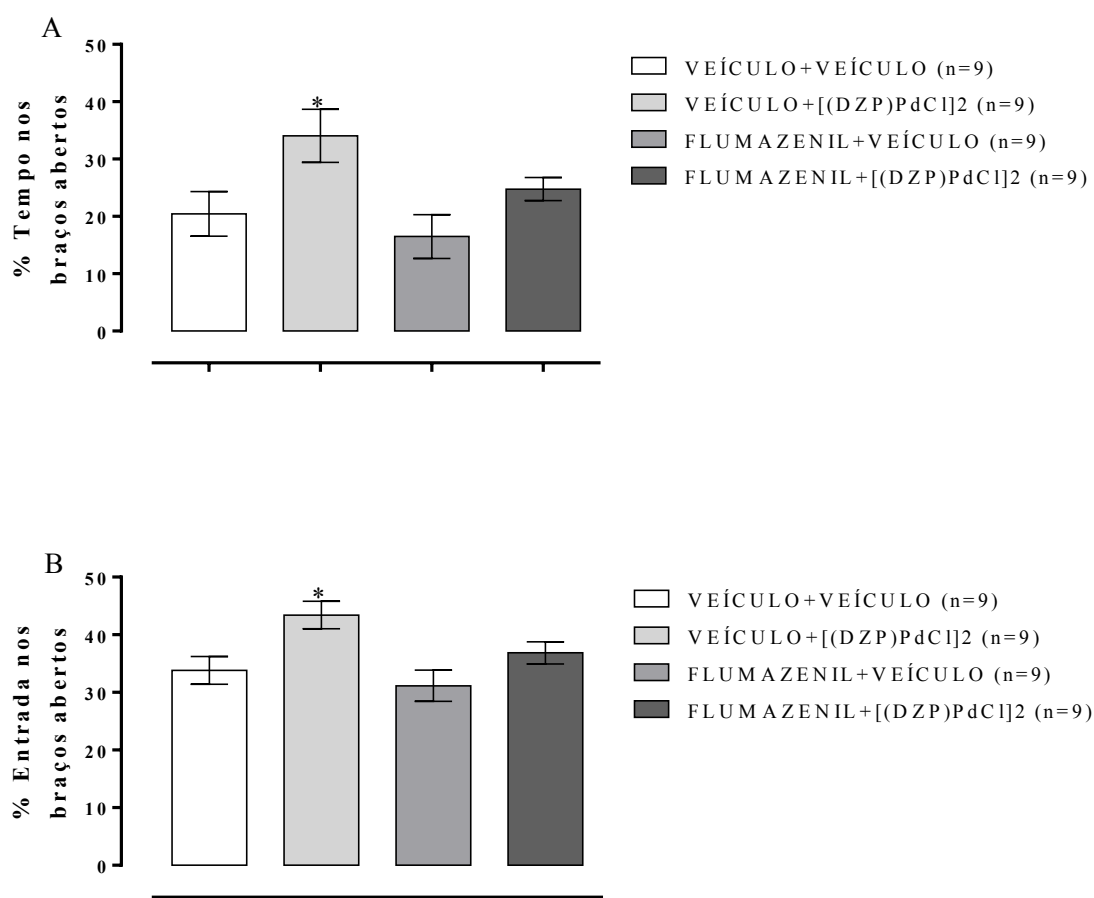
8.6.1. Labirinto em cruz elevado

A análise por ANOVA uma via, seguida do post-hoc, revelou que o complexo [(DZP)PdCl]₂ (Grupo VEÍCULO+[(DZP)PdCl]₂) aumentou de forma significativa a %TBA ($F_{3, 32} = 4,120$, $P=0,014$; Figura 15A) e a %EBA ($F_{3, 32} = 4,926$; $P = 0,0063$; Figura 15B), quando comparado ao grupo controle no LCE.

A análise post-hoc não revelou nenhuma diferença significativa entre os animais tratados com flumazenil (Grupo FLUMAZENIL+VEÍCULO) e o grupo controle na %TBA e %EBA no LCE (Figuras 15A e 15B, respectivamente). De modo semelhante, a ANOVA uma via também não detectou diferença significativa entre o grupo que recebeu o pré-tratamento com o flumazenil e o tratamento com o complexo metálico (Grupo FLUMAZENIL+[(DZP)PdCl]₂) e o grupo controle nos parâmetros espaço-temporais do LCE (Figura 15A e 15B).

Em relação aos parâmetros etológicos do LCE, a ANOVA uma via não detectou diferença significativa entre os diferentes grupos analisados [uHD ($F_{3, 32} = 0,8634$; $P = NS$), pSAP ($F_{3, 32} = 2,125$; $P = NS$) e REA ($F_{3, 32} = 1,478$; $P = NS$); Tabela 3]. Também não foi detectada diferença significativa entre os grupos analisados no EBF do LCE (EBF, $F_{3, 32} = 1,160$; $P = NS$; Tabela 3).

Figura 15. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,15mg/Kg) e do flumazenil (2mg/Kg) no labirinto em cruz elevado (LCE).



Porcentagem de tempo (A) e de entradas (B) nos braços abertos do LCE. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. e *P<0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Tabela 3. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,15mg/Kg) e do flumazenil (2mg/Kg) no número de entradas dos braços fechados (EBF) e nos parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

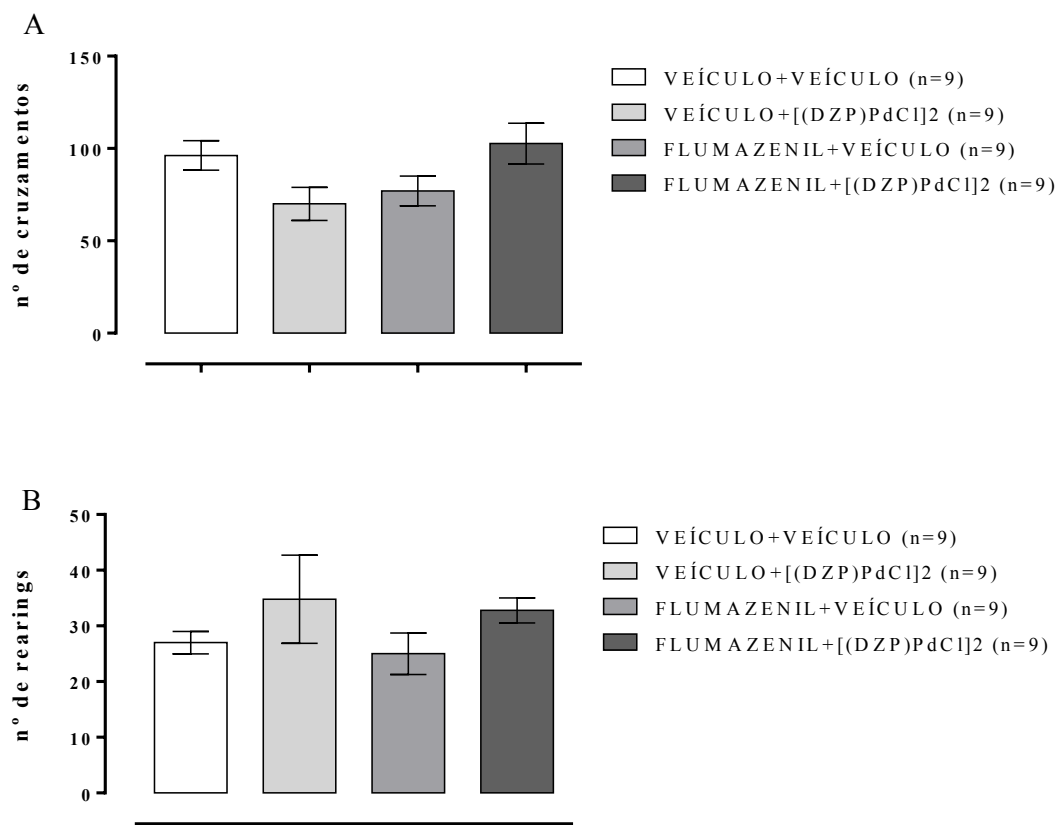
Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados do LCE			
	EBF	uHD	pSAP	REA
VEÍCULO+VEÍCULO (n=9)	11,56 $\pm$ 0,58	16,22 $\pm$ 1,64	4,33 $\pm$ 0,67	16,67 $\pm$ 0,93
VEÍCULO +[(DZP)PdCl] ₂ (n=9)	11,44 $\pm$ 0,87	15,89 $\pm$ 0,98	2,22 $\pm$ 0,70	20,78 $\pm$ 1,65
FLUMAZENIL+ VEÍCULO (N=9)	9,89 $\pm$ 1,14	13,33 $\pm$ 1,94	3,44 $\pm$ 0,69	16,78 $\pm$ 2,05
FLUMAZENIL+[(DZP)PdCl] ₂ (N=9)	11,78 $\pm$ 0,43	16,56 $\pm$ 1,61	2,55 $\pm$ 0,53	16,78 $\pm$ 1,81

uHD= unprotected head-dipping não protegido, pSAP= stretch-attend posture protegido, REA= rearings, CRUZ= cruzamentos. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. P=NS (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

8.6.2. Teste do campo aberto (CA)

Em relação ao teste do campo aberto, a ANOVA uma via não detectou nenhuma diferença significativa em relação ao número de cruzamentos ($F_{3, 32} = 2,891$; $P=NS$; Figura 16A) e de *Rearing* ($F_{3, 32} = 1,005$; $P=NS$, Figura 16B) entre os grupos analisados.

Figura 16. Efeitos da administração do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ (0,15mg/Kg) e do flumazenil (2mg/Kg) no teste do campo aberto (CA).



Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M. $P=NS$ (ANOVA uma via seguida do teste de Newman Keuls).

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂

A farmacoterapia disponível para o tratamento dos transtornos de ansiedade tem se tornado cada vez mais acessível e, além disso, houve um aumento na variabilidade de fármacos utilizados para o seu tratamento. Essa disponibilidade abrange desde os antidepressivos, os BZDs e as novas opções terapêuticas, que atuam modulando a neurofisiologia da ansiedade patológica. No entanto, ainda existe uma grande deficiência da eficácia terapêutica disponível, seja pelos efeitos adversos associados a esses fármacos ou pela resistência a terapia disponível apresentada por parte dos pacientes (BYSTRITSKY, 2006; CHEN et al., 2018; FARACH et al., 2012).

Essas falhas terapêuticas são o objetivo das buscas contínuas por novos fármacos que tenham eficácia semelhante ou superior aos tratamentos atualmente disponíveis, mas que apresentem menos efeitos adversos associados ao seu uso, assim como atinjam de maneira ampla os indivíduos com transtornos de ansiedade (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017; MURROUGH et al., 2016). Os BZDs possuem um tempo para início de ação bastante curto quando comparado aos demais fármacos disponíveis e, por esse motivo, fármacos que atuem de maneira semelhante são bastante investigados (CHEN et al., 2017).

Nossos resultados demonstram que o complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂, na dose de 0,15mg/Kg, apresentou um efeito do tipo ansiolítico em camundongos *Swiss* fêmeas submetidos ao LCE, por aumentar a %TBA e %EBA, quando comparados ao grupo controle. Ambos os parâmetros representam medidas espaço-temporais já bem validadas na avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade (BOURIN et al., 2007; UYS et al., 2003). LOLLI et al. (2006) relataram o efeito tipo ansiolítico induzido por extratos da *Passiflora actinia* em camundongos *Swiss* que foram submetidos ao LCE e, assim como o [(DZP)PdCl]₂, apresentaram maior %TBA e %EBA quando comparado ao grupo controle (LOLLI et al., 2006). Resultado semelhante também ao obtido por BRITO et al. (2017) com um composto cíclico derivado da piperazina [LQFM032] (BRITO et al., 2017).

Em relação aos parâmetros etológicos do LCE, nossos resultados não mostraram diferença significativa entre as diferentes doses do complexo e o grupo controle. Esses parâmetros tem a finalidade de garantir maior sensibilidade ao teste, dentre eles, o uHD e o pSAP analisam o comportamento natural do animal de avaliar situações de risco quando se sentem ameaçados. O aumento do número de uHD e de pSAP pode ser um indicativo de

comportamento do tipo ansioso de forma que a ausência de diferença significativa entre os animais tratados com o complexo $[(DZP)PdCl]_2$ não apresentaram, esse comportamento quando comparados ao grupo controle (KAESERMANN, 1986; WALF; FRYE, 2007).

A análise do número EBF consiste em uma medida indireta da interferência de uma substância na atividade locomotora. Além disso, o número de entradas nos braços fechados pode ser utilizado para avaliar se o efeito ou ausência do efeito do tipo ansiolítico pode estar associado a uma interferência na locomoção dos animais (CRYAN; HOLMES, 2005; UYS et al., 2003). Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa no número de EBF entre os animais que receberam doses do complexo metálico derivado do diazepam e o grupo controle que recebeu apenas o veículo, isso demonstra que o efeito ansiolítico apresentado não tem interferência da atividade locomotora.

A análise dos resultados obtidos na CCE não demonstrou o efeito do tipo ansiolítico em nenhuma das doses do complexo metálico derivado do diazepam $[(DZP)PdCl]_2$. Neste teste, o efeito do tipo ansiolítico é verificado pela maior permanência do animal no compartimento claro da caixa, a latência para entrada e o número de entrada no compartimento escuro. O modelo da caixa claro-escuro é baseado na aversão de roedores a ambientes iluminados de forma que esses animais normalmente tendem a permanecer por mais tempo no ambiente escuro (BOURIN et al., 2007; GRAEFF; ZANGROSSI JR, 2002).

A utilização de mais de um teste animal para ansiedade em um ensaio farmacológico é baseada no fato de que a reprodutibilidade da ansiedade humana fica limitada em apenas um teste (RAMOS, 2008; STEIMER, 2011). Embora o LCE e a CCE sejam modelos que se baseiam na resposta etológica de animais expostos a situações de conflito, o ambiente aversivo ao qual o animal é exposto é diferente, enquanto no LCE esse ambiente consiste em uma área aberta e elevada, a CCE consiste em um ambiente bastante iluminado (CRYAN; HOLMES, 2005; RAMOS et al., 2008; STEIMER, 2011). Tais fatores podem estar relacionados com as repostas diferentes do complexo metálico derivado do diazepam no LCE e na CCE e também foi observado na avaliação do efeito ansiolítico do óleo essencial de *Juniperus virginiana* (ZHANG; YAO, 2018).

6.2. Efeito do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ sobre a atividade locomotora e na memória

O uso dos BZDs no tratamento da ansiedade tem sido limitado pela variedade de efeitos adversos associados ao seu uso. Dentre esses efeitos, a interferência psicomotora e o prejuízo na memória interferem diretamente na execução de tarefas cotidianas pelos indivíduos em tratamento (CHEN et al., 2018; FARACH et al., 2012).

O teste do campo aberto é o modelo mais utilizado e validado para avaliação da atividade locomotora de animais. A interferência na locomoção é medida através da avaliação do número de cruzamentos e de *rearings* executados pelos animais, uma diminuição no número desses parâmetros é caracterizado como hipolocomoção (GRIEBEL; HOLMES, 2013; RODGERS et al., 1997). Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos das diferentes doses do complexo metálico e o grupo controle e, dessa forma, pode-se inferir que o tratamento com [(DZP)PdCl]₂ não promove alterações na atividade locomotora.

A associação do estudo da atividade locomotora a testes que avaliam o efeito tipo ansiolítico de substâncias que atuem de modo semelhante aos BZDs é bastante realizada em virtude do efeito sobre a locomoção apresentado pelos mesmos. De modo semelhante ao observado como o complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂, estudo de outras substâncias também apresentaram efeito do tipo ansiolítico sem interferência da atividade locomotora, *e.g.*, o ácido ursólico (COLLA et al., 2015), o extrato de *Passiflora actinia* (LOLLI et al., 2006) e o derivado cíclico da piperazina (BRITO et al., 2017).

Por sua vez, a análise dos resultados do SD também demonstrou que a administração do complexo metálico, nas diferentes doses, não promoveu efeito amnésico, visto que não houve diferença significativa na latência para descer da plataforma. O SD é bastante empregado como modelo de avaliação de prejuízo da memória pelo tratamento agudo se substâncias, o efeito amnésico é observado pelo menor tempo de latência entre os animais que não receberam tratamento com a substância em estudo e o grupo controle (DUARTE et al., 2012; KAMEYAMA; NABESHIMA; KOZAWA, 1986).

O efeito amnésico dos BZDs tem sido amplamente demonstrado em vários estudos que avaliam possível efeito amnésico de substâncias. LOLLI e col. demonstraram o efeito ansiolítico promovido pela diazepam ao analisar o efeito ansiolítico de um derivado oxidazol (LOLLI et al., 2006). TABATABAI e col., por sua vez demonstrou que o efeito amnésico do

diazepam é dose-dependente no qual a dose de 1mg/Kg, dose ansiolítica do fármaco, já foi capaz de reduzir significativamente a latência para descer da plataforma do SD (TABATABAI et al., 2015).

6.3. Modulação gabaérgica no efeito do tipo ansiolítico do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂]

O neurotransmissor GABA é considerado a maior fonte de neurotransmissão inibitória envolvida com os comportamentos relacionados ao medo e a ansiedade. Vários estudos em modelos animais têm demonstrado que a administração do próprio neurotransmissor ou de um agonista do GABA é capaz de promover a redução de diversos parâmetros de avaliação de comportamento semelhante à ansiedade (CHEN et al., 2018). Os BZDs possuem um sítio específico no receptor GABA_A cuja ativação aumenta o tempo de ligação do GABA ao receptor (CALHOON; TYE, 2015; CHEN et al., 2017)

Nossos resultados demonstraram que o efeito do tipo ansiolítico encontrado no LCE com o complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl₂] na dose de 0,15mg/Kg foi bloqueado com o flumazenil (antagonista competitivo dos BZDs). Estes dados são indicaivos que o efeito ansiolítico previamente encontrado foi promovido pelo mesmo mecanismo de modulação do receptor GABA_A dos BZDs. Nossos dados também demonstraram que o flumazenil *per se* não apresentou efeito algum, visto que não houve diferença significativa entre esse grupo e o grupo controle.

Como já demonstrado anteriormente, o efeito do tipo ansiolítico promovido pelo complexo metálico não tem interferência da atividade locomotora, visto que não houve diferença significativa no número de EBF entre os grupos analisados. A avaliação da atividade locomotora no CA mais uma vez demonstraram que o complexo metálico [(DZP)PdCl₂] não promove alteração na atividade locomotora dos animais na dose de 0,15mg/Kg, efeito positivo em relação aos BZDs atualmente disponíveis.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que a administração do complexo metálico derivado do diazepma $[(DZP)PdCl]_2$ (0,15mg/Kg, i.p.) produziu um efeito do tipo ansiolítico em camundongos *Swiss* fêmeas submetidos ao teste do LCE e que esse efeito não foi observado em animais submetidos a CCE, podendo estar associado aos diferentes parâmetros da ansiedade abordados nesse teste.

Nossos resultados também demonstraram que o complexo $[(DZP)PdCl]_2$ na dose de 0,15mg/Kg não promove alterações na atividade locomotora e nem efeito amnésico que é comum aos benzodiazepínicos. Além disso, os resultados obtidos no LCE demonstram que o efeito do tipo ansiolítico promovido pelo complexo $[(DZP)PdCl]_2$ mediado via receptor $GABA_A$.

Novos estudos são necessários para analisar aspectos farmacocinéticos do complexo metálico $[(DZP)PdCl]_2$. A investigação da toxicidade do complexo metálico $[(DZP)PdCl]_2$ também se faz necessária para garantir maior segurança. Apesar disso, nossos dados apontam o complexo metálico derivado do diazepam $[(DZP)PdCl]_2$ como uma possível alternativa no tratamento dos transtornos de ansiedade.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-V: Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (5ª Ed.)**. [s.l: s.n.].

ARAÚJO, Á. C.; NETO, F. L. A Nova Classificação Americana Para os Transtornos Mentais – o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. XVI, n. 1, p. 67–82, 2014.

ARIKIAN, S. R.; GORMAN, J. M. A Review of the Diagnosis, Pharmacologic Treatment, and Economic Aspects of Anxiety Disorders. **Primary Care Companion J Clin Psychiatry**, v. 3, n. 3, p. 110–117, 2001.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93–107, 2017.

BARROS, W. B. Z. G. et al. Palladium-benzodiazepine derivatives as promising metallodrugs for the development of antiepileptic therapies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 129–135, 2016.

BORWIN BANDELOW; SOPHIE MICHAELIS; DIRK WEDEKIND. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. No.2, p. 93–107, 2017.

BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 6, p. 567–574, 2007.

BRAGA, J. E. F. Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93–100, 2010.

BRITO, A. F. et al. Anxiolytic-like effect of 2-(4-((1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol is mediated through the benzodiazepine and nicotinic pathways. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 90, n. 3, p. 432–442, 2017.

BYSTRITSKY, A. Treatment-resistant anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 9, p. 805–814, 2006.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 101–111, 2013.

CASTILLO, A. et al. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria (Supl II)**, v. 22, n. m, p. 22–25, 2000.

CHEN, X. et al. Pharmacodynamic response profiles of anxiolytic and sedative drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 83, p. 1028–1038, 2017.

CHEN, X. et al. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. **Acta Pharmacologica Sinica**, n. October, p. 1–12,

2018.

COLLA, A. R. S. et al. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European journal of pharmacology**, v. 758, p. 171–176, 2015.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. Model organisms: The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 775–790, 2005.

DARREL A. REGIER, E. A. The de Facto US Mental and Addictive Disorders Service System. **Archives of General Psychiatry**, v. 50, n. 2, p. 85, 1993.

DUARTE, F. S. et al. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology**, v. 227, n. 2, p. 209–219, 2012.

FAJEMIROYE, J. O. et al. Treatment of anxiety and depression: Medicinal plants in retrospect. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 198–215, 2016.

FARACH, F. J. et al. Pharmacological and Brain Stimulation Treatment of Anxiety Disorders: Current Treatments and Future Directions. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 26, p. 833–843, 2012.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, p. 429–436, 2010.

FERLE, A. Síntese , Caracterização Estrutural e Propriedades Ópticas de Complexos de Ouro (I) Baseados em Ligantes Derivados de Núcleos Pirazolínicos Síntese , Caracterização Estrutural e Propriedades Ópticas de Complexos de Ouro (I) Baseados em Ligantes Deriva. [s.l: s.n.].

GIRISH, C. et al. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice. **European journal of pharmacology**, v. 710, n. 1–3, p. 49–58, 2013.

GRAEFF, F. G. Medicamentos Ansiolíticos. p. 123–160, 1970.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JR, H. Anxiety Disorders Animal Models of Anxiety Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 779–893, 2002.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 Years of Hurdles and Hope in Anxiolytic Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 9, p. 667–687, 2013.

GURWITZ, D.; WEIZMAN, A. New drug targets for depression and anxiety: Is the peptides era arriving? **Drug Development Research**, v. 65, n. 3, p. 93–96, 2005.

GUZMÁN, S. L.; REYES, R.; BONILLA, H. Medicinal plants for the treatment of “ nervios ”, anxiety , and depression in Mexican Traditional Medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, p. 591–608, 2014.

KAESERMANN, H. P. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. **Psychopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 31–37, 1986.

KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T.; KOZAWA, T. Step-down-type Passive Avoidance- and Escape-learning Method. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 16, p. 39–52, 1986.

KENT, J. M.; COPLAN, J. D.; GORMAN, J. M. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 9, p. 812–824, 1998.

LACH, G. et al. Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 1, p. 36–59, 2018.

LI, S. H.; GRAHAM, B. M. Why are women so vulnerable to anxiety, trauma-related and stress-related disorders? The potential role of sex hormones. **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 1, p. 73–82, 2017.

LI, Y. et al. Involvement of Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons in Basolateral Amygdala in Anxiety-like Phenotype of Prenatally Stressed Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 6, p. 570–581, 2018.

LOCKE, A. B.; KIRST, N.; SHULTZ, C. G. Diagnosis and Management of Generalized Anxiety Disorder and Panic Disorder in Adults. **American Family Physician**, v. 91, n. 9, p. 617–624, 2015.

LOLLI, L. F. et al. Possible involvement of GABAA-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 308–314, 2006.

MANSOURI, M. T. et al. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 40–46, 2013.

MCLEAN ET AL. Gender Differences in Anxiety Disorders: Prevalence, Course of Illness, Comorbidity and Burden of Illness. v. 45, n. 8, p. 1027–1035, 2011.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 2014.

MURROUGH, J. W. et al. Emerging Drugs for the Treatment of Anxiety. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 20, n. 2, p. 1393–406, 2016.

OLSEN, R. W. GABA-Benzodiazepine-Barbiturate Receptor Interactions. v. 7, 1981.

PIERRE-MARIE, R. Annals of Internal Medicine Article Pulmonary Embolism Diagnosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 10, p. 678–685, 2009.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in**

Pharmacological Sciences, v. 29, n. 10, p. 493–498, 2008.

RAMOS, A. et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 2, p. 277–288, 2008.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111–118, 2011.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289–304, 1997.

SAKI, K.; BAHMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAELI, M. The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S34–S42, 2014.

SHADER, R. I.; GREENBLATT, D. J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 19, p. 1398–1405, 1993.

SMITH, G. W. et al. Corticotropin Releasing Factor Receptor 1–Deficient Mice Display Decreased Anxiety, Impaired Stress Response, and Aberrant Neuroendocrine Development. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1093–1102, 1998.

STARKSTEIN, S. Sigmund Freud and the Psychoanalytical Concept of Fear and Anxiety. In: **A Conceptual and Therapeutic Analysis of Fear**. [s.l: s.n.]. p. 231–257.

STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues Thierry. v. 13, p. 495–506, 2011.

STENZEL-POORE, M. P. et al. CRH Overproduction in Transgenic Mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 780, n. 1, p. 36–48, 1996.

TABATABAI, S. A. et al. Evaluation of anxiolytic, sedative-hypnotic and amnesic effects of novel 2-phenoxy phenyl-1,3,4-oxadizole derivatives using experimental models. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. December 2014, p. 51–57, 2015.

TEIGEN, K. H. Yerkes-Dodson: A Law for all Seasons. **Theory & Psychology**, v. 4, n. 4, p. 525–547, 1994.

UYS, J. D. K. et al. Animal Models of Anxiety Disorders. **Anxiety Disorders**, v. 5, p. 274–281, 2003.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

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

WITTMANN, W. et al. Prodynorphin-derived peptides are critical modulators of anxiety and regulate neurochemistry and corticosterone. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 775–

785, 2009.

ZHANG, K.; YAO, L. The anxiolytic effect of *Juniperus virginiana* L. essential oil and determination of its active constituents. **Physiology and Behavior**, v. 189, p. 50–58, 2018.

ANEXO

Figura 17. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Nº 29/2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

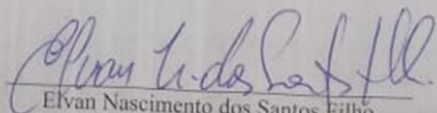


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal do complexo metálico derivado do diazepam [(DZP)PdCl]₂ nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e memória em camundongos Swiss fêmeas”, registrada com o nº 29/2018, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Marcelo Duzzioni**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 06 de julho de 2018.

Vigência da autorização	20.07.2018 a 20.07.2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	190
Peso/idade	35 g / 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL)
Colaboradores	Fernanda M. A. de Souza, Dannyele C. S. P. Nicácio, José G. S. Neto, Gabriela T. S. Cavalcante, Mirella P. S. Vieira, Ozileudiane B. S. da Silva e Gabriela F. De Souza

Maceió, 16 de julho de 2018.



Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479