UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

Efeitos do clonazepam sobre as respostas defensivas medidas em ratos submetidos ao labirinto em T elevado.

Marcel Adriano Lopes

Ribeirão Preto – SP

2010

Marcel Adriano Lopes

Efeitos do clonazepam sobre as respostas defensivas medidas em ratos submetidos ao labirinto em T elevado.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Marcel Adriano

Efeitos do clonazepam sobre as respostas defensivas medidas no labirinto em T elevado. Ribeirão Preto, 2010.

83p.:il.:30cm

Dissertação de mestrado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Zangrossi Junior, Hélio.

1. Labirinto em T elevado; 2. Clonazepam; 3. Pânico/ Ansiedade; 4. GABA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcel Adriano Lopes

Efeitos do clonazepam sobre as respostas defensivas medidas no labirinto em T elevado.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____/ ____/ _____

Banca Examinadora

Dr Hélio Zangrossi Júnior
Instituição: FMRP – USP Assinatura _____

Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca
Instituição: FMRP – USP Assinatura _____

Dra. Elisabeth Aparecida Audi
Instituição: UEM Assinatura _____

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante”.

(Paulo Coelho)

Dedico esta conquista:

Aos meus queridos pais **Antonio Carlos e Emília**, que sempre me apoiaram e incentivaram a acreditar nos meus sonhos.

Mãe você é o meu exemplo de dignidade, determinação, humildade superação, amor e sucesso. Obrigado por ser minha mãe !!!

As minhas queridas irmãs **Érica e Carina**, obrigado pelas orações e pelo apoio, vocês são as melhores irmãs que alguém pode ter amo vocês!!!

A você **Cássia**, pelo seu apoio, carinho, paciência e AMOR.

Esta conquista é nossa!!!!! Agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida!!

Amor, obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr., agradeço a oportunidade e a confiança em mim depositadas na realização deste trabalho. Obrigado por me mostrar os caminhos da ciência e pelo seu exemplo de profissionalismo.

Agradeço as professoras, Drª. Sâmia Regiane Lourenço Joca e Drª. Elisabeth Aparecida Audi, por tão prontamente aceitarem participar desta banca, enriquecendo este trabalho. A participação de vocês neste trabalho é uma honra. Desculpem pela correria.

Ao Afonso Paulo Padovan, pelo excelente suporte técnico, pela amizade, pelas risadas e pelo incentivo, Muito obrigado.

Aos amigos do laboratório: Val, Daniele, Thatiane, Paula, Ailton, Adrielli, Plínio, Vanessa e Roger, obrigado pela convivência, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos da farmacologia, vocês de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do departamento de farmacologia, pela excelente hospitalidade e auxílio dispensado durante a realização deste trabalho.

À Sonia Maria Stefanelli, Fátima Helena Petean e Waldik Ramon pela, disponibilidade, atenção e paciência.

A todos os funcionários da Biblioteca Central da USP-Ribeirão Preto, pela eficiência e simpatia no atendimento aos alunos.

Às funcionárias do biotério Maria Inês Nemoto e Eliana Barros, pelo cuidado dispensado aos animais.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À família **NEVES** obrigado pela confiança, apoio e carinho.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Danilo, Carlos, Rafael, Neto e Gustavo, obrigado pela amizade, pelos almoços, risadas e pelo convívio, valeu!!!

Aos amigos de graduação, Preto e Adriano. Obrigado pela amizade e pelo que vivenciamos, mesmo em caminhos diferentes, a nossa amizade permanece verdadeira.

À ***DEUS***,

por me fortalecer e ajudar a superar as dificuldades e ser presença constante em minha vida!!!

Resumo

Lopes, Marcel Adriano. **Efeitos do clonazepam sobre as respostas defensivas medidas em ratos submetidos ao labirinto em T elevado.** 2010. 83f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2010.

O labirinto em T elevado (LTE) é um modelo etológico, que evoca comportamentos defensivos correlacionados com o transtorno de ansiedade generalizada (esquiva inibitória) e o transtorno do pânico (fuga). Apesar da validação farmacológica da tarefa de esquiva inibitória deste modelo estar bem estabelecida, algumas questões em relação à tarefa de fuga não estão claras. Resultados prévios da literatura mostram que drogas clinicamente eficazes no tratamento do transtorno do pânico, como antidepressivos tricíclicos (ex: imipramina e clomipramina) e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex: fluoxetina e escitalopram), aumentam a latência de fuga no LTE, sugerindo efeito do tipo panicolítico. Entretanto, em relação aos benzodiazepínicos de alta potência, também amplamente utilizados na clínica para o tratamento do transtorno do pânico, os dados em relação ao LTE permanecem desconhecidos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da administração aguda ou repetida (7 ou 14 dias) de clonazepam em ratos submetidos ao LTE. Dada a importância da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) na gênese do transtorno do pânico, verificamos se o efeito da administração aguda de clonazepam no LTE era bloqueado pela administração prévia intra-SCPD do antagonista de receptores BZD flumazenil. Nossos resultados mostram que o tratamento agudo com clonazepam diminuiu as latências de esquiva inibitória e aumentou as latências de fuga do braço aberto, indicativo de efeito ansiolítico e panicolítico, respectivamente. Já a administração repetida deste mesmo benzodiazepínico, seja por 7 ou 14 dias, diminuiu as latências de esquiva inibitória, sem alterar as respostas de fuga. A administração intra-SCPD do antagonista de receptores benzodiazepínicos flumazenil não bloqueou o efeito da administração aguda de clonazepam sobre as respostas defensivas medidas no LTE. Os resultados do presente estudo mostram ainda que o efeito do clonazepam sobre a resposta de fuga é dependente da maneira pela qual a aquisição da resposta de esquiva inibitória é realizada, ou seja, o tratamento agudo com clonazepam foi capaz de alterar esta resposta somente quando a esquiva inibitória foi realizada com 6 tentativas. Em suma, nossos dados mostram que a administração aguda de clonazepam promove efeito panicolítico e ansiolítico no LTE. No entanto, deve ser ressaltado que o efeito panicolítico do clonazepam foi apenas observado após a introdução de uma mudança metodológica no teste do LTE. De uma maneira geral, os resultados obtidos sustentam a associação entre o comportamento de fuga e ataques de pânico.

Abstract

Lopes, Marcel Adriano. **Effect of clonazepam on the defensive responses measured in rats tested in the elevated T maze.** 2010. 83f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2010.

The elevated T maze (ETM) is an ethological model that generates in rats defensive behaviors in rats which have been associated with generalized anxiety (inhibitory avoidance) and panic (escape) disorders. A wealth of evidence in the literature supports the validity of the ETM inhibitory avoidance task for detecting the effects of generalized anxiety-effective drugs. However, the effect of panic-effective drugs on escape performance has not been fully investigated yet. Previous studies showed that panic-ameliorating drugs such as tricyclic antidepressants (e.g. imipramine and clomipramine) and selective serotonin reuptake inhibitors (e.g. fluoxetine and escitalopram), increase escape latencies in the ETM, suggesting a panicolytic-like effect. The effect of high-potency benzodiazepines agonists such as clonazepam and alprazolam, also widely used for the treatment of panic disorder, remains unknown. In this study we investigated the effect of acute or repeated administration (7 or 14 days) of clonazepam in rats submitted to the ETM. Given the attributed importance of the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) in the genesis/regulation of panic disorder, we also investigated whether the effects caused by the acute administration of clonazepam in ETM can be blocked by prior intra-dPAG administration of the BZD receptor antagonist flumazenil. Our results showed that acute treatment with clonazepam impaired inhibitory avoidance acquisition and increased escape latencies, suggesting anxiolytic and panicolytic effects, respectively. Repeated administration of clonazepam, either for 7 or 14 days, also impaired inhibitory avoidance acquisition, but did affect escape expression. Intra-dPAG injection of flumazenil did not block the effect of clonazepam on the defensive responses measured in ETM. Our results also showed that the effect of clonazepam on the escape response is dependent on the way inhibitory avoidance acquisition is measured, i.e. the drug anti-escape effect was only observed in group of animals that had 6 but not 3 trials to acquire inhibitory avoidance. Altogether, our data show that clonazepam causes both anxiolytic and panicolytic effects on ETM, in accordance to its therapeutic profile. However, it should be emphasized that the panicolytic effect of clonazepam was only observed after the introduction of a methodological modification in the ETM test protocol. Overall, our findings support the proposed association between escape behavior and panic attacks.

Listas

Lista de Figuras

Figura 1. Labrinto em T elevado 39

Figura 2. Arena do teste do campo aberto 40

Figura 3. Efeito da administração aguda de clonazepam 50

Figura 4. Efeito da administração por 7 dias de clonazepam 52

Figura 5. Efeito da administração por 14 dias de clonazepam 54

Figura 6. Efeito da administração na substância cinzenta periaquedutal dorsal de flumazenil 56

Figura 7. Efeito do tratamento agudo com clonazepam em animais injetados intra-SCPD com flumazenil 58

Figura 8. Efeito da administração aguda de clonazepam em animais submetidos ao labirinto em T elevado 60

Figura 9. Efeito da administração aguda de clonazepam em animais submetidos ao labirinto em T elevado, com 6 tentativas de esquiva 62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação dos Benzodiazepínicos 26

Tabela 2. Média (±EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto realizada pelos animais dos experimentos 1 a 3 63

Índice

Índice

1. Introdução 18

1.1 - Ansiedade e o Transtorno de Pânico 19

1.2 - Tratamento Farmacológico do Transtorno de Pânico 21

1.3 – Neurobiologia do Transtorno do Pânico 27

2. Objetivos 35

3. Materiais e Métodos 37

3.1.Animais 38

3.2. Drogas 38

3.3. Aparatos Experimentais 38

3.4. Procedimentos 40

4. Resultados 47

4.1. Experimento 1A 48

4.2. Experimento 1B 51

4.3. Experimento 1C 53

4.4. Experimento 2A 55

4.5. Experimento 2B 57

4.6. Experimento 3 59

5. Discussão 64

6. Conclusão 72

Referências Bibliográficas 74

1. Introdução

1.1 - Ansiedade e o Transtorno de Pânico

A ansiedade, assim como o medo, são sentimentos por nós experienciados ao longo de toda a vida, denominados emoções (Graeff, 1994,1999). Estas emoções são resultantes de mecanismos neurobiológicos que nos permitem lidar com situações emergenciais e de estresse, sendo importante tanto para o desempenho quanto para a sobrevivência do ser humano. Exemplificando, podemos mencionar o desconforto que sentimos antes de fazermos uma apresentação em público: além de alterações autonômicas, como sudorese, taquicardia, exibimos alterações comportamentais, como nervosismo e agitação (Parente *et al*., 2005). Mesmo sendo desconfortável, este estado normal de ansiedade tem valor adaptativo e benéfico, estimulando o indivíduo a se preparar, a fim de obter êxito em sua apresentação.

Quando a ansiedade está presente em níveis maiores do que os considerados normais e benéficos, passa a ser inconveniente e incapacitante, sendo considerada patológica, com necessidade de intervenção farmacológica e/ou psicológica (Graeff e Brandão, 1999).

Dentre os transtornos de ansiedade classificados pela Associação Psiquiátrica Americana (APA, 2000) está o transtorno de pânico (TP). Segundo a atual classificação realizada por esta entidade e publicada no DSM IV-RT, em 2000, o TP é caracterizado pela presença de ataques de pânico recorrentes e inesperados, seguidos, por pelo menos um mês, de preocupações persistentes acerca de ter outro ataque de pânico ou preocupações com as implicações ou conseqüências do ataque anterior ou ainda a presença de alguma alteração comportamental significativa. Um ataque de pânico é descrito como um período

de intenso temor ou desconforto, acompanhado de pelo menos quatro dos seguintes sintomas: palpitações ou ritmo cardíaco acelerado, sudorese, tremores, sensações de falta de ar ou sufocamento, dor ou desconforto torácico, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio, sensação de irrealidade ou despersonalização, medo de perder o controle ou enlouquecer, medo de morrer, parestesias ou ondas de calor.

Em geral, dois terços dos pacientes com transtorno de pânico também desenvolvem agorafobia, que é definida como uma ansiedade ou esquiva de locais ou situações, dos quais o auxílio pode não estar disponível no caso de ter um ataque de pânico, ou sintomas do tipo pânico (Kessler *et al*., 2006). O transtorno de pânico pode acarretar grandes prejuízos ao paciente, principalmente se estiver acompanhado de agorafobia, limitando as atividades profissionais e sociais do indivíduo. Estudos epidemiológicos em todo o mundo indicam que a prevalência do transtorno de pânico (com ou sem agorafobia) durante toda a vida encontra-se em 1,5% a 3,5% (DSM IV-RT, 2000). Especificamente na população brasileira, a prevalência do transtorno de pânico, em períodos de seis meses a um ano, é de 0,4% a 2,3% e de até 3,5% ao longo da vida. Esta pequena diferença entre períodos discretos e a prevalência ao longo da vida sugere uma tendência a cronicidade desta condição clínica (Bernik, 2001). É importante ressaltar que aliado a estes índices, encontra-se uma alta taxa de utilização de serviços de saúde por pacientes portadores de transtorno do pânico, sendo que um terço destes pacientes procura atendimento médico devido a sintomas somáticos, por estes serem passíveis de confusão com sintomas cardiovasculares (Marchesi *et al*.,

2001; Marchesi *et al*., 2004, Simon e Fischmann, 2005). Em vista disto, os custos para pacientes com transtorno do pânico são maiores do que para outros transtornos de ansiedade (Pollack e Marzol, 2000). Além disso, estes pacientes apresentam altos índices de problemas com sociabilidade e qualidade de vida tão baixa quanto à de pacientes com depressão maior (Pollack e Marzol, 2000; Arbabzadeh-Bouchez *et al.*, 2002).

Sendo assim, indivíduos que apresentam transtorno de pânico necessitam de tratamentos farmacológicos e/ou psicológicos, que visam à melhora na qualidade de vida e sociabilidade destas pessoas.

1.2 - Tratamento Farmacológico do Transtorno de Pânico

Atualmente, dois tipos de terapias são empregados para o tratamento do TP, a cognitiva/comportamental e a farmacoterapia. Estas visam à redução da intensidade/freqüência ou o bloqueio dos ataques de pânico (Marchesi, 2008). Neste trabalho daremos enfoque a farmacoterapia.

Diferentes classes de drogas são empregadas no tratamento do TP: os antidepressivos tricíclicos (ADT), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), os inibidores da enzima mono-aminoxidase (IMAO) e os benzodiazepínicos (Susman & Klee, 2005).

Os ADTs atuam através do bloqueio da recaptação de monoaminas (noradrenalina, dopamina e/ou serotonina) aumentando a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica (Baldessarini, 2006). A eficácia dos ADTs no tratamento do TP foi inicialmente evidenciada em estudos de

Donald Klein (1964), nos quais foi observado que os ataques de ansiedade eram reduzidos após a terceira semana de tratamento com imipramina, enquanto que, os sintomas de ansiedade crônica diminuíam somente com tratamento por mais de 3 semanas. Baseando-se nesses achados clínicos, Klein diferenciou a ansiedade crônica dos ataques de ansiedade, que posteriormente, seriam denominados ataques de pânico.

Além disso, evidências indicam a eficácia de outros ADTs no tratamento do TP, como a clomipramina. Neste sentido, Cavaljuga e colaboradores (2003) conduziram um estudo duplo cego controlado, comparando pacientes com TP que foram tratados com clomipramina ou ISRS fluoxetina por 10 semanas. Os autores observaram que os pacientes que receberam clomipramina, assim como os que receberam fluoxetina apresentaram diminuição na freqüência e na intensidade de ocorrência dos ataques de pânico após 6 semanas de uso repetido.

Porém, esta classe de drogas apresenta alguns efeitos indesejáveis que induzem cautela no seu emprego clínico. Entre estes estão: efeitos anticolinérgicos (visão borrada, constipação, hipotensão), alfa adrenérgicos (hipotensão), histaminérgicos (sedação, aumento do apetite), assim como efeitos cardiotóxicos (Westenberg 1996).

A segunda classe de drogas empregada no tratamento do TP são os IMAOs (Nies, 1984). Estes atuam inibindo a enzima monoamina oxidase (enzima responsável pela degradação das monoaminas), e desta forma aumentam a concentração destas na fenda sináptica. Buigues e colaboradores (1987) realizaram um estudo clínico com o IMAO fenelzina com pacientes

ambulatoriais que preenchiam os critérios do DSM-III para transtorno do pânico. Os resultados deste estudo demonstraram que, após várias semanas de uso repetido, a fenelzina foi capaz de diminuir os ataques de pânico dos pacientes.

Entretanto, existem informações contraditórias mostrando que os IMAOs também podem apresentar efeito agudo no tratamento do TP. Tiller e colaboradores (1999) realizaram um estudo multicêntrico com pacientes que apresentavam ataques de pânico e demonstraram que o IMAO moclobemida foi capaz de reduzir agudamente a incidência de tais ataques. O uso dos IMAOs no tratamento do TP é limitado, já que estes podem produzir crises hipertensivas em pacientes quando ingeridos concomitantemente com a tiramina, um constituinte encontrado principalmente no queijo e no vinho (Brown *et al.,*1989).

Uma terceira classe de drogas são os ISRS. Estes são assim chamados por inibirem preferencialmente a recaptação da monoamina serotonina, aumentando a concentração desta na fenda. A primeira droga desta classe empregada na terapia do TP foi a fluoxetina (Pecknold *et al*., 1994). Michelson e colaboradores (1999) realizaram um estudo duplo cego controlado, comparando pacientes com TP que foram tratados com fluoxetina e placebo. Os pacientes responsivos ao tratamento agudo (2-10 semanas) com a fluoxetina foram selecionados para continuarem o tratamento completando 24 semanas. Ao final deste estudo, observou que estes pacientes, ao longo de 24 semanas, mantiveram a diminuição na freqüência e intensidade de ocorrência dos ataques de pânico.

Além da fluoxetina, outros ISRS também apresentam eficácia no TP, dentre eles, temos a sertralina (Pollack *et al*., 1998) e o citalopram (Lepola *et al*., 1998).

Pollack e colaboradores (1998) realizaram um estudo multicêntrico com a sertralina em pacientes que apresentavam ataques de pânico. Neste estudo, um dos parâmetros de avaliação utilizado foi a Escala de Ansiedade Antecipatória e Pânico de Sheehan, que têm como medida principal o número de ocorrência de ataques de pânico. Os resultados deste estudo demonstraram que houve uma redução na ocorrência dos ataques somente no final da segunda semana de uso repetido da sertralina.

Lepola e colaboradores (1998) conduziram um estudo duplo cego controlado de longa duração (1 ano) comparando pacientes com TP que foram tratados com citalopram ou placebo, e observou que os pacientes que receberam citalopram apresentaram diminuição na freqüência e intensidade de ocorrência dos ataques de pânico em relação aos pacientes que receberam placebo.

Uma das desvantagens do uso dos ISRS é que o início do tratamento com estas drogas pode ser acompanhado de inquietação exagerada, aumento de ansiedade e um longo período de latência para o início da resposta (Ballenger 1994; Liebowitz *et al*., 1988; Nierenberg *et al*., 2000).

Desta forma, recomenda-se iniciar a administração do antidepressivo com baixas doses e, algumas vezes, associar um benzodiazepínico por um tempo limitado. A combinação desses fármacos promove melhora dos

sintomas nas primeiras semanas, conforme observado em estudo duplo-cego (Goddard *et al*., 2001).

Outra classe de drogas, de particular interesse para o presente trabalho, é constituída pelos BZDs. Estes têm sido amplamente utilizados na farmacoterapia do transtorno do pânico (Rosenbaum *et al*, 1997; Chouinard, 2004). Diferentemente das três classes de drogas (ADT, ISRS e os IMAO) que atuam aumentando a concentração de monoaminas no SNC, os BZDs atuam intensificando as ações do ácido gama-aminobutírico (GABA).

Os BZDs ligam-se aos receptores benzodiazepínicos (rBZD), que estão localizados no receptor $GABA_A$, formando um complexo macromolecular em que o rBZD exerce modulação alostérica no processo de abertura/fechamento do canal (Haefely *et al*., 1993). A mudança na conformação do receptor GABA, gerada pela ligação do BZD com o rBZD potencializa a ação desse neurotransmissor. A ativação do GABA provoca aumento transitório da condutância dos canais de cloreto, resultando em hiperpolarização da membrana (Zorunski *et al.*,1991).

De acordo com a potência os BZDs são classificados em: baixa, média e alta potência (Chouinard 2004).

A indicação terapêutica dos BZDs está diretamente ligada à potência e às propriedades farmacocinéticas. Sendo assim, os BZDs de alta potência têm sido empregados no tratamento do transtorno do pânico (ver tabela 1) (para revisão ver Chouinard 2004).

Tabela 1 - Classificação dos Benzodiazepínicos:

Potência/ Benzodiazepínico	Indicações Terapêuticas	Meia-vida(h) Eliminação	Afinidade de Ligação (K_i, nM)
Baixa			
Clordiazepóxido	Ansiedade Generalizada Leve ou Insônia	7-30	...
Oxazepam			11,53
Temazepam			23,50
Média			
Diazepam	Ansiedade Generalizada Média ou Insônia	20-80	9,57
Estazolam		10-24	...
Alta			
Alprazolam		6-20	4.24
Bromazepam	Ataques de Pânico, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Insônia, Agitação, Mania	8-19	...
Clonazepam		5-30	0,51
Lorazepam		10-20	1,64

Adaptado de Chouinard, 2004.

Estudos mostram que os BZDs foram as drogas mais prescritas clinicamente para o tratamento do transtorno de pânico nos USA, entre os anos de 1988 a 2002 (Susman & Klee, 2005). Por exemplo, Tesar e colaboradores (1991) realizaram um estudo duplo-cego com pacientes que apresentavam ataque de pânico e observaram que o clonazepam reduziu a incidência de tais ataques. Corroborando este achado, Beuclair e colaboradores (1994) realizaram um estudo duplo-cego controlado ao longo de 4 semanas com pacientes com TP e observaram que o clonazepam foi capaz de reduzir rapidamente (1 semana) a freqüência e intensidade de ocorrência dos ataques de pânico destes pacientes.

Entretanto, o TP, por se tratar de uma condição crônica, exige o uso de medicamento por um tempo prolongado, sendo assim, a monoterapia com benzodiazepínicos não é mais tida como primeira escolha no tratamento do TP, em função do risco de dependência e/ou tolerância farmacológica (Rickels *et al*., 1983; Peckenold, 1993; Michelini *et al*., 1996).

1.3 - Neurobiologia do Transtorno de Pânico

Estudos com animais de laboratório têm propiciado o melhor entendimento das bases neurobiológicas do TP, bem como sobre o mecanismo de ação terapêutica de drogas eficazes no tratamento deste transtorno.

Estes trabalhos baseiam-se nos estudos realizados originalmente por Charles Darwin e publicados, em 1872, no livro “A expressão das emoções nos homens e nos animais”. Sob a perspectiva evolutiva traçada por Darwin, os estados emocionais de ansiedade e medo expressos pelos seres humanos

teriam raízes nas reações defensivas apresentadas pelos animais e compartilhada em uma escala filogenética (Panksepp, 1982; Marks, 1987; Graeff, 1994; Hofer, 1995; Stein e Bouwer, 1997). Com base nesta perspectiva, diversos estudos sobre o substrato neural destes estados emocionais foram conduzidos com animais de laboratório, buscando desvendar as bases neurais do medo e da ansiedade.

Estudos chave para a compreensão das reações defensivas de animais de laboratório têm sido conduzidos pelo casal Robert e Caroline Blanchard trabalhando no Havaí. Estes pesquisadores observaram os comportamentos apresentados por roedores perante o confronto com predadores. Segundo os autores, os estímulos ameaçadores podem ser classificados em: potencial (incerto), distal e proximal, cada um evocando estratégias de defesa distintas, representadas em níveis de defesa (Blanchard & Blanchard, 1988).

O primeiro nível de defesa é evocado por um estímulo potencial (como por exemplo, pistas da presença do predador). Em resposta ao estímulo potencial, o animal apresenta o comportamento de avaliação de risco, composto por repetidas tentativas de aproximação, seguidas de esquiva ao estímulo ameaçador (Blanchard & Blanchard, 1988).

Por sua vez, o segundo nível de defesa ocorre quando o perigo é real, porém distal, ou seja, quando o predador esta presente e já foi detectado pela presa, mas está a uma distância segura e não iniciou o ataque predatório. Nesta situação, havendo a disponibilidade de rotas de saída o animal foge, caso a fuga não seja possível, o animal exibe o comportamento de congelamento (Blanchard & Blanchard, 1988).

Por fim, o terceiro nível ocorre em situação de perigo proximal, quando o predador ou fonte de perigo está muito próximo ou em contato com a presa. Neste caso, são observadas respostas de fuga explosiva, ameaça defensiva (vocalizações) ou agressão defensiva (postura de ameaças e mordidas ao predador) (Blanchard & Blanchard, 1988).

Com base nestes trabalhos, estudos farmacológicos têm indicado haver uma correlação entre os comportamentos expressos nos diferentes níveis de defesa e transtornos de ansiedade distintos, sendo o primeiro e o segundo níveis de defesa relacionados com o transtorno de ansiedade generalizada e o terceiro nível de defesa com o transtorno do pânico (Blanchard *et al*., 1986, 1993, 1998, 2001). Neste sentido, Blanchard e colaboradores (2001) demonstraram, utilizando a bateria de teste medo/defesa, que o comportamento de fuga não é alterado pelo tratamento com drogas ansiolíticas clássicas, como o diazepam, porém, estas drogas são capazes de alterar o comportamento de avaliação de risco. Adicionalmente, neste mesmo teste, dois benzodiazepínicos de alta potência, utilizados no tratamento do transtorno do pânico, o alprazolam e o clonazepam (Charney et al., 1986; Ballenger et al., 1988), reduziram a resposta de fuga.

Baseado em evidências como estas, a resposta de fuga tem sido associada, em diferentes protocolos experimentais, ao ataque de pânico. Um exemplo desta associação tem sido proposto a partir da indução da resposta de fuga pela estimulação elétrica (Schenberg, 2001) ou química (Beckett, 1992) da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD).

A SCPD é uma estrutura mesencefálica, inervada por uma abundante

rede de vias aferentes e eferentes, considerada como uma estrutura cerebral bastante complexa (Beitz *et al*., 1986; Cameron *et al*., 1995; Veening *et al*., 1991). Esta profusa inervação da SCP está implicada na participação desta estrutura em muitas funções fundamentais à sobrevivência do organismo, dentre elas: o processamento e a modulação da informação dolorosa, a mediação do controle motor, do controle cardiovascular e das respostas de ansiedade e medo (Beitz *et al*., 1990, 1995).

A estimulação desta estrutura evoca comportamentos de luta e fuga, acompanhados por mudanças neurovegetativas, tais como vasodilatação da musculatura esquelética, dilatação pupilar, taquicardia, aumento da pressão sanguínea e da freqüência respiratória (Carrive,1993). Tais reações defensivas, promovidas pela estimulação da SCPD, são similares àquelas evocadas por situações naturais de perigo (para revisão ver Graeff, 2004), que visam dar suporte fisiológico à emissão de reações defensivas (Carrive,1993). Estudos de neuroimagens conduzidos em humanos suportam o conceito de que alterações estruturais e funcionais na SCPD estariam envolvidas na neurobiologia do transtorno do pânico (Graeff e Del Ben, 2008). Assim, diante de perigo proximal, a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) seria ativada, participando significativamente da integração da resposta de fuga (Gentil, 1988; Graeff, 1988; Deakin e Graeff, 1991).

Nashold e colaboradores (1969, 1974) relataram que, em humanos, a estimulação elétrica de áreas mesencefálicas dorsais, compreendendo a SCPD, desencadeava fortes sensações desagradáveis, como medo, pavor, ansiedade intensa, e morte eminente, além de alterações fisiológicas como dor

torácica profunda, taquicardia, dispnéia, sensação de calor ou frio, e urgência de micção.

Diversos grupos de pesquisa exploram a resposta de fuga gerada pela estimulação elétrica ou química da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SPCD) de animais de laboratório (Carrive,1993; Schenberg, 2001; Beckett, 1992; Audi *et al*., 1984; de Bortoli *et al*., 2008) como modelo de pânico.

Em estudo conduzido por Vargas e colaboradores (2001), no qual as reações defensivas geradas pela estimulação elétrica da SCPD de roedores são analisadas em uma arena circular, onde o aumento gradual da frequência de estimulação elétrica desencadeia alterações comportamentais e neurovegetativas, como: imobilidade, corrida, saltos, exoftalmia, micção e defecação. Os autores relatam que a administração crônica, mas não a aguda das drogas panicolíticas, como fluoxetina e clorpromazina ocasionam um aumento na frequência de estimulação elétrica necessária para propiciar estas respostas (Vargas *et al*., 2001; Schenberg *et al.*, 2002). Estudos realizados com drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica e serotonérgica como o clonazepam e o alprazolam foram capazes, de maneira dose-dependente, de reduzir a resposta de fuga evocada pela estimulação elétrica da SCPD (Jenck *et al.,* 1995).

No modelo da estimulação química da SCPD, o aminoácido excitatório dl- ácido homocistéico (DLH) quando microinjetado tanto na porção rostral quanto na caudal da SCPD, gera comportamento motor explosivo típico da reação de defesa a ameaças proximais. A duração da resposta deste comportamento e do número de voltas e saltos é quantificada em uma arena (Beckett, 1992). Após estudos realizados com a administração de imipramina

de maneira crônica, foi observado que esta droga potencializa a inibição da reposta de fuga obtida com a microinjeçao na SCPD do agonista de receptores serotonérgicos do tipo 1A o 8-OH-DPAT (Mongeau *et al*., 1997).

Outros modelos animais têm associado a fuga com situações mais naturalísticas; estes são denominados modelos etológicos. Os modelos etologicamente fundamentados apresentam algumas vantagens, pois não utilizam estímulos nocivos como choques elétricos e privação de água ou alimentos. Além disso, estes modelos não necessitam de treino ou modelagem do comportamento do animal e são de baixo custo operacional (Pelow *et al*., 1985, File, 1990; Lister, 1990; File, 1992). Neste sentido, surge o labirinto em T elevado (LTE), de particular interesse para o presente trabalho.

O LTE é composto por um braço fechado e dois abertos, todos elevados em relação ao solo. Este modelo é derivado do labirinto em cruz elevado e baseia-se no medo que os roedores possuem de locais elevados e desprotegidos (Montgomery 1955; Walk *et al*., 1957; Pellow *et al*., 1985; Treit *et al*., 1993). No entanto, diferente do labirinto em cruz elevado, o LTE permite observar, separadamente, as respostas de esquiva inibitória e de fuga em um mesmo animal (Graeff *et al*., 1993b; Viana *et al*., 1994).

Para avaliar a resposta de esquiva inibitória, o animal é colocado por três vezes consecutivas no fim do braço fechado e é verificado o tempo que leva para sair com as quatro patas deste braço em cada tentativa. Observa-se que o tempo de saída do braço fechado aumenta ao longo das tentativas, devido ao caráter aversivo que este estímulo representa ao animal (Zangrossi e Graeff, 1997). Após as sessões de esquiva, é verificado o comportamento de fuga. Para tal, o animal é colocado, por três vezes

consecutivas, na extremidade distal de um dos braços abertos e a latência para sair com as quatro patas deste braço é verificada.

Estudos direcionados à validação farmacológica do LTE através da administração crônica de drogas clinicamente eficazes no tratamento do TP como clomipramina, fluoxetina e escitalopram, mostraram que estas drogas foram capazes de aumentar as latências de fuga do braço aberto do LTE, efeito do tipo panicolítico, porém somente o escitalopram diminuiu as latências de esquiva inibitória do braço fechado (Poltronieri *et al*., 2003, Pinheiro *et al*., 2008). Já a imipramina, além de inibir a resposta de fuga, também prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, sugestivo de efeito ansiolítico. Esses resultados corroboram pressupostos teóricos (Viana *et al*., 1994; Graeff *et* al., 1997 e 1998; Zangrossi *et al*., 2001) de que a fuga dos braços abertos do LTE, em termos clínicos, estaria relacionada ao transtorno do pânico.

A injeção periférica do peptídeo colecistoquinina (CCK-8s) foi capaz de diminuir as latências de fuga do braço aberto no LTE, efeito do tipo panicogênico, sem alterar as latências de esquiva inibitória (Zanovelli *et al*., 2004). Estes dados estão de acordo com dados clínicos, os quais indicam que a administração sistêmica de agonista de receptor CCK_B em humanos provoca ataques de pânico (Bradwejn *et al*., 1991).

Neste modelo, estudos com diferentes compostos ansiolíticos, como o agonista de receptores BZD diazepam, os agonistas $5\text{-}HT_{1A}$ buspirona e ipsapirona, e o antagonista de receptores $5\text{-}HT_{2A}$, ritanserina, drogas que não atuam no TP, quando administrados sistemicamente não alteraram a resposta

de fuga, por outro lado diminuíram a resposta de esquiva inibitória (Zanoveli *et al*., 2005; Viana *et al*., 1994; Graeff 1998).

Embora a validação farmacológica da tarefa de esquiva inibitória esteja bem estabelecida neste modelo (Viana *et al*., 1994; Graeff, 1998; Zanoveli *et al*., 2005), algumas questões em relação à tarefa de fuga não estão claras. Sabe-se que antidepressivos tricíclicos, como a imipramina e ISRS, como fluoxetina e o escitalopram, aumentam a latência de fuga no LTE. Entretanto, com relação aos benzodiazepínicos de alta potência, já utilizados na clínica para o tratamento do transtorno do pânico, os dados relacionados ao LTE ainda permanecem desconhecidos.

No presente trabalho, procuramos estender os estudos de validação farmacológica no LTE, principalmente no que tange ao efeito de drogas panicolíticas sobre a resposta de fuga. Para tal, investigamos o efeito neste modelo experimental causado pela administração aguda ou crônica do agonista de receptores BZD de alta potência clonazepam.

Além disso, devido à relevância da SCPD na regulação/elaboração de comportamentos relacionados ao pânico, averiguamos se o efeito do clonazepam no LTE pode ser antagonizado pela administração intra-SCPD do antagonista de receptores BZD flumazenil.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar o efeito do tratamento periférico com clonazepam sobre as respostas defensivas geradas no LTE.

Objetivos Específicos

- Experimentos 1A, 1B e 1C, verificar respectivamente, o efeito da injeção (i.p) aguda, por 7 ou 14 dias de clonazepam em animais submetidos ao LTE.

- Experimento 2B, investigar se o efeito do clonazepam sobre a resposta de fuga do braço aberto do LTE é decorrente da ativação dos receptores benzodiazepínicos localizados na SCPD.

- Experimento 3, comparamos o efeito da injeção aguda de clonazepam no LTE realizado segundo o procedimento padrão do teste ou segundo o procedimento adotado no experimento 1 (esquiva inibitória mensurada em 6 tentativas).

Visando determinar um possível efeito das drogas sobre a atividade locomotora dos animais, após o teste no LTE, todos os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

3. Material e Métodos

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos, *Wistar* (260 – 330 gramas), provenientes do Biotério Central do Campus da USP - Ribeirão Preto. Os animais foram agrupados em 4 por caixa de polipropileno (39x32x17cm), com livre acesso à água e comida. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório, à temperatura de 22 ± 2 ºC, com ciclo claro-escuro de 12 horas, com início às 7:00 h.

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) desta universidade (**protocolo nº 101/2008**).

3.2 - Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: clonazepam (Roche, Brasil), diazepam (Roche, Brasil), flumazenil (Sigma, EUA) As drogas foram diluídas em 2% de Tween 80 em salina estéril (veículo), exceto flumazenil diluído em DMSO (dimetil-sulfóxido, Sigma, EUA) 2% em salina estéril.

3.3 - Aparatos Experimentais

O Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado é constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões (50 cm de comprimento por 12 cm de largura), elevados 50 cm em relação ao solo **(Figura 1)**. Um dos braços é circundado por paredes laterais e está disposto perpendicularmente aos dois outros braços, que

permanecem desprovidos de paredes. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma tira de acrílico transparente de 1 cm de altura (Graeff et al 1993b).

Figura 1 - Labirinto em T elevado.

O Campo Aberto

O campo aberto consiste em uma arena quadrada de madeira, medindo 60x60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura **(Figura 2)**.

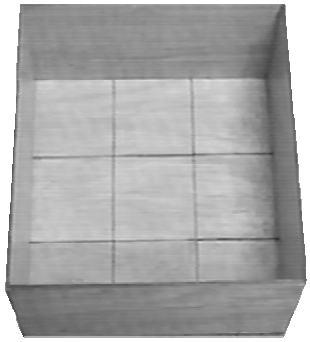

Figura 2 - Arena do teste do campo aberto.

3.4 – Procedimentos

3.4.1 - *Cirurgia estereotáxica para implante de cânula-guia*

Sete dias antes dos testes comportamentais, os animais testados nos Experimentos 2A e 2B (ver abaixo) foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich, EUA) 2,5% (10 mL/Kg, i.p.). Após a indução anestésica, uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil) foi administrada (0,2 mL/animal, i.m.), a fim de prevenir possíveis infecções. Além disso, foi administrado (2,5 mg/mL/Kg, s.c.) um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética (Banamine, Schering-Plough S/A-Brasil).

Os animais foram então adaptados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA), e, a seguir, foi realizada a limpeza do campo cirúrgico com uma solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%. Na região da incisão foi administrado, por via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol 100, S.S. White-Brasil). Poucos minutos após, realizou-se a incisão longitudinal a fim de expor a calvária e remover o periósteo por raspagem.

Na seqüência, um orifício foi perfurado com uma broca dental para a fixação de um parafuso de aço inoxidável. Este parafuso serviu como âncora da prótese de acrílico disposta no crânio do animal. Outro orifício foi perfurado para a introdução da cânula guia (12mm) a uma distância de 1,9mm lateralmente ao lâmbda, a uma profundidade de 3,2mm a partir da superfície craniana e inclinação de 22º (Paxinos and Watson 1997). A cânula-guia foi fixada à calota craniana por meio de uma resina acrílica autopolimerizável. Finalmente, introduziu-se pela cânula-guia um mandril de aço inoxidável, de mesmo comprimento, para evitar possíveis entupimentos da cânula.

3.4.2 - Testes Comportamentais

Habituação

Cada animal foi levado para a sala de teste a fim de ser habituado às condições experimentais. Lá, o animal foi manuseado pelo experimentador por 5 minutos e, em seguida, foi colocado em uma gaiola de acrílico com serragem no assoalho onde permaneceu por 5 minutos. Esta mesma gaiola foi utilizada como coadjuvante na execução do teste do labirinto em T elevado. Tanto nos dias da habituação quanto no dia de teste, a sala foi iluminada com lâmpada de 40 W, com ruído constante fornecido pelo exaustor de ar.

Pré-exposição ao braço aberto do labirinto em T elevado

No dia seguinte à última sessão de habituação, todos os animais foram deixados individualmente, por trinta minutos, em um dos braços abertos do LTE. Os braços abertos foram separados do braço fechado por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e a

porção proximal do braço aberto. Os animais foram pré-expostos 24 horas antes da realização do teste.

No dia do teste, após sorteio prévio, os animais do **experimento 1A** receberam injeção única, ip, de clonazepam (1, 2 e 4mg/kg), diazepam (2mg/kg) ou veículo. Dessa forma, os seguintes grupos foram formados: *veículo* (n=12), *clonazepam 1mg/kg* (n=13), *clonazepam 2mg/kg* (n=09), *clonazepam 4mg/kg* (n=10) e *diazepam 2mg/kg* (n=10). Já no **experimento 1B**, os animais foram tratados com as mesmas doses anteriormente citadas de clonazepam, só que por 7 dias consecutivos. Assim, foram formados os grupos: *veículo* (n=13), *clonazepam 1mg/kg* (n=13), *clonazepam 2mg/kg* (n=14) e *clonazepam 4mg/kg* (n=12). No **experimento 1C**, os animais foram tratados com as mesmas doses anteriormente citadas de clonazepam, porém por 14 dias. Assim, foram formados os grupos: *veículo* (n=13), *clonazepam 1mg/kg* (n=13), *clonazepam 2mg/kg* (n=14) e *clonazepam 4mg/kg* (n=12).

Nos experimentos 1A, 1B e 1C, trinta minutos após a última administração os animais foram testados no LTE.

As doses de clonazepam foram escolhidas de acordo com estudos de Griebel e colaboradores (1996) e estudo piloto realizado no laboratório.

Para a execução do teste do LTE, adotamos uma modificação quanto à mensuração da resposta de esquiva inibitória. Ao contrário do procedimento padrão, que é realizado por meio de 3 tentativas de esquiva inibitória (Zangrossi *et al*., 2001), utilizamos 6 tentativas. Isto se deu em função de estudos pilotos mostrarem que os animais controles, na época do experimento,

tinham uma baixa aprendizagem da esquiva inibitória. Para validar este procedimento, no experimento 1A, o efeito do clonazepam no LTE foi comparado ao de uma droga benzodiazepínica padrão, o diazepam. A resposta de fuga foi mensurada seguindo os mesmos parâmetros previamente padronizados.

O teste no LTE começou pela medida da resposta de esquiva inibitória. Para tal, os animais foram colocados primeiramente na extremidade distal do braço fechado, sendo cronometrado, para cada animal, o tempo gasto para sair com as quatro patas deste braço em 6 tentativas consecutivas (linha de base, esquiva 1 e esquiva 2, esquiva 3, esquiva 4, esquiva 5), separadas por um período de 30 segundos.

Para a verificação da latência de fuga, os animais foram colocados na extremidade do braço aberto onde foram previamente expostos, cronometrando-se o tempo de saída deste braço, em 3 tentativas consecutivas (fuga 1, fuga 2 e fuga 3), com intervalos de 30 segundos entre elas. O tempo máximo de permanência do animal em cada tentativa (esquiva ou fuga) foi de 5 minutos. Trinta segundos após a tomada de Fuga 3, o animal foi colocado na arena para a observação da atividade locomotora durante 5 minutos. Esta atividade locomotora, medida através da distância total percorrida, foi analisada por meio do programa analisador de imagem (Ethovision - versão 1.96; Noldus, Holanda).

No **experimento 2A,** após sorteio prévio, os animais foram administrados intra-SCPD com o antagonista de receptores benzodiazepínicos flumazenil (20, 40 e 80nmols) ou veículo. Dessa forma, os seguintes grupos

foram formados: *veículo* (n=6), *flumazenil 20 nmols* (n=6*) flumazenil 40 nmols* (n=9) e flumazenil 80 nmols (n=8). Dez minutos após os animais foram testados no LTE. As doses de flumazenil foram definidas com base em resultados de Russo (1993).

No **experimento 2B,** os animais receberam administração intra-SCPD de flumazenil (20 nmols) ou veículo. Dez minutos após a administração intra-SCPD, receberam a injeção de clonazepam 4mg/kg (i.p) ou veículo (DMSO a 2% em salina estéril). Desta forma os seguintes grupos foram formados: (tratamento intra-SCPD/tratamento periférico agudo): *veículo/veículo* (n=10), *veículo/clonazepam* (n=10), *flumazenil/veículo* (n=8), *flumazenil/clonazepam* (n=8). Trinta minutos após, os animais foram submetidos ao teste no LTE.

Para a injeção intra-SCPD, utilizou-se uma agulha odontológica (0,6mm de diâmetro externo), a qual foi inserida pela cânula-guia, até atingir o alvo, abaixo da extremidade da cânula. A agulha odontológica (de 14 mm) foi conectada a uma microsseringa (Hamilton 95-N, 5 µL, SYR [26s/2”/2], EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10), preenchido com água destilada. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno foi utilizado para verificar se a droga foi realmente microinjetada. Para controle do volume e tempo de injeção, foi utilizada uma bomba microinjetora digital (modelo 55-2222, Harvard Apparatus), de forma que um volume de 0,2 µL de droga foi administrado durante 2 minutos.

O teste do LTE foi realizado segundo o procedimento padrão descrito na literatura (Zangrossi *et al*., 2001). Ou seja, ao invés de 6 tentativas de esquiva inibitória, como nos experimentos 1A, 1B e 1C, foram realizadas 3 tentativas de esquiva inibitória.

Após o término dos testes comportamentais nos experimentos 2A e 2B, os animais foram anestesiados com uretana 25% (10ml/kg) e submetidos à microinjeção na SCPD de 0,2µl de corante azul de Evans a 1% e posterior perfusão intracardíaca com salina (NaCl a 0,9%) e formol (10%). Após a perfusão os encéfalos foram retirados e fixados em formol a 10% para posterior análise histológica.

Os cérebros foram cortados em secções coronais de 60µm de espessura em um criostato de congelação (Leica CM1850) para verificação microscópica do sítio de microinjeção, segundo as fotos micrografias do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram incluídos na análise estatística os animais que tiveram a ponta da agulha de microinjeção localizada na SCPD.

No **experimento 3A,** os animais receberam injeção única ip, de clonazepam (1, 2 e 4mg/kg) ou veículo. Dessa forma, os seguintes grupos foram formados: *veículo* (n=10), *clonazepam 1mg/kg* (n=9), *clonazepam 2mg/kg* (n=10), *clonazepam 4mg/kg* (n=10). Trinta minutos após a última administração os animais foram testados no LTE.

Os animais neste experimento foram testados segundo procedimento padrão (3 esquivas inibitórias e 3 fugas).

No **experimento 3B,** os animais receberam administração única ip, de clonazepam (4mg/kg) ou veículo. Dessa forma, os seguintes grupos foram formados: *veículo* (n=8), *clonazepam 4mg/kg* (n=8). Trinta minutos após a última administração os animais foram testados no LTE.

Os animais neste experimento foram testados em 6 esquivas consecutivas e 3 fugas.

Análise estatística

Os dados obtidos no LTE dos experimentos citados foram submetidos a uma análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA), tendo como fator independente o tratamento farmacológico e as tentativas, de esquiva inibitória ou de fuga, como fator dependente. Os dados do campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via. Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan ou teste *t* de Student.

4. Resultados

4.1 - Experimento 1A

Efeito da administração aguda de clonazepam

A figura **3A** mostra o efeito da administração aguda de clonazepam e de diazepam sobre o comportamento de esquiva inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostra que a latência de saída dos animais do braço fechado do LTE aumentou ao longo das tentativas, indicando aquisição da resposta de esquiva inibitória [$F(5,245)= 27,49$; $p < 0,05$]. Além disso, houve efeito do tratamento [$F(4,49)= 4,20$; $p < 0,05$], bem como interação entre os fatores [$F(20,245)= 1,99$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* indica uma diferença significativa nos grupos tratados com clonazepam, 1 mg/kg e 4 mg/kg, nas esquivas 1 a 5 (E1 a E5), em relação ao grupo controle. O mesmo efeito foi observado após o tratamento com diazepam (2mg/kg) nas esquivas 2 a 5 (E2 a E5) em relação ao grupo controle [Duncan; $p < 0,05$].

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito da administração aguda de clonazepam e diazepam sobre as latências de fuga. A ANOVA mostra que não houve efeito da tentativa [$F(2,98)= 2,43$; $p = 0,09$], porém houve efeito do tratamento [$F(4,49)= 6,86$; $p < 0,05$], bem como interação entre estes dois fatores [$F(8,98)= 2,01$; $p = 0,05$]. A análise *post-hoc* indica uma diferença significativa no grupo tratado com clonazepam 4mg/kg nas fugas 1 e 3 (F1 e F3), em relação ao grupo controle. Da mesma forma, o tratamento com clonazepam 1 e 2mg/kg apresentou diferença nas fugas 2 e 3 (F2 e F3). Os animais tratados com diazepam não apresentaram alteração nas latências de fuga.

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o clonazepam e o diazepam não alteraram a atividade locomotora dos animais [$F(4,49)= 0,55$; $p > 0,05$].

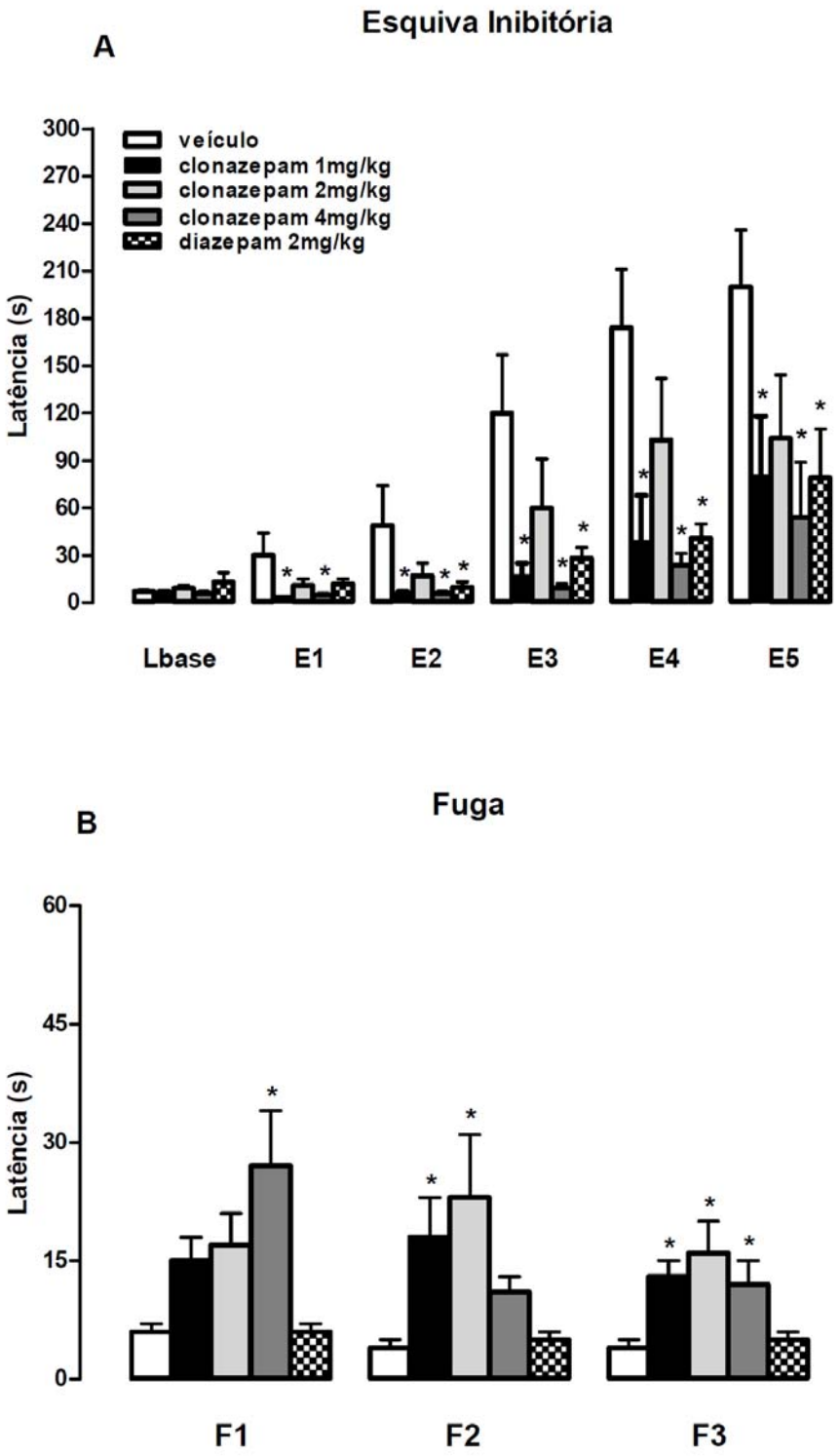

Figura 3 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1, E2, E3, E4 e E5) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à injeção aguda de clonazepam e diazepam. * p, 0,05, comparados ao grupo veículo em uma mesma tentativa (n= 9 -13 para os grupos).

4.2 - Experimento 1B

Efeito da administração de clonazepam por 7 dias

O efeito da administração, por 7 dias, de clonazepam sobre o comportamento de esquiva inibitória pode ser observado na figura **4A**. A ANOVA de medidas repetidas mostra que a latência de saída dos animais do braço fechado do LTE aumentou ao longo das tentativas, indicando aquisição da resposta de esquiva inibitória [fator tentativa: $F(5,240) = 12,12$; $p < 0,05$]. Houve efeito do tratamento [$F(3,48)= 6,16$; $p < 0,05$], bem como interação entre os fatores [$F(15,240)= 2,92$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* indica uma diferença significativa nas 3 doses de clonazepam nas esquivas 2 a 5 (E2 a E5), em relação ao grupo controle.

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito da administração subcrônica de clonazepam sobre a latência de fuga. A ANOVA mostra que houve efeito da tentativa [$F(2,96)= 3,02$; $p = 0,05$], porém não houve efeito do tratamento [$F(3,48)=1,56$; $p > 0,05$], ou interação entre estes dois fatores [$F(6,96)= 1,81$; $p > 0,05$].

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o clonazepam não alterou a atividade locomotora dos animais [$F(3,48)= 0,35$;$p > 0,05$].

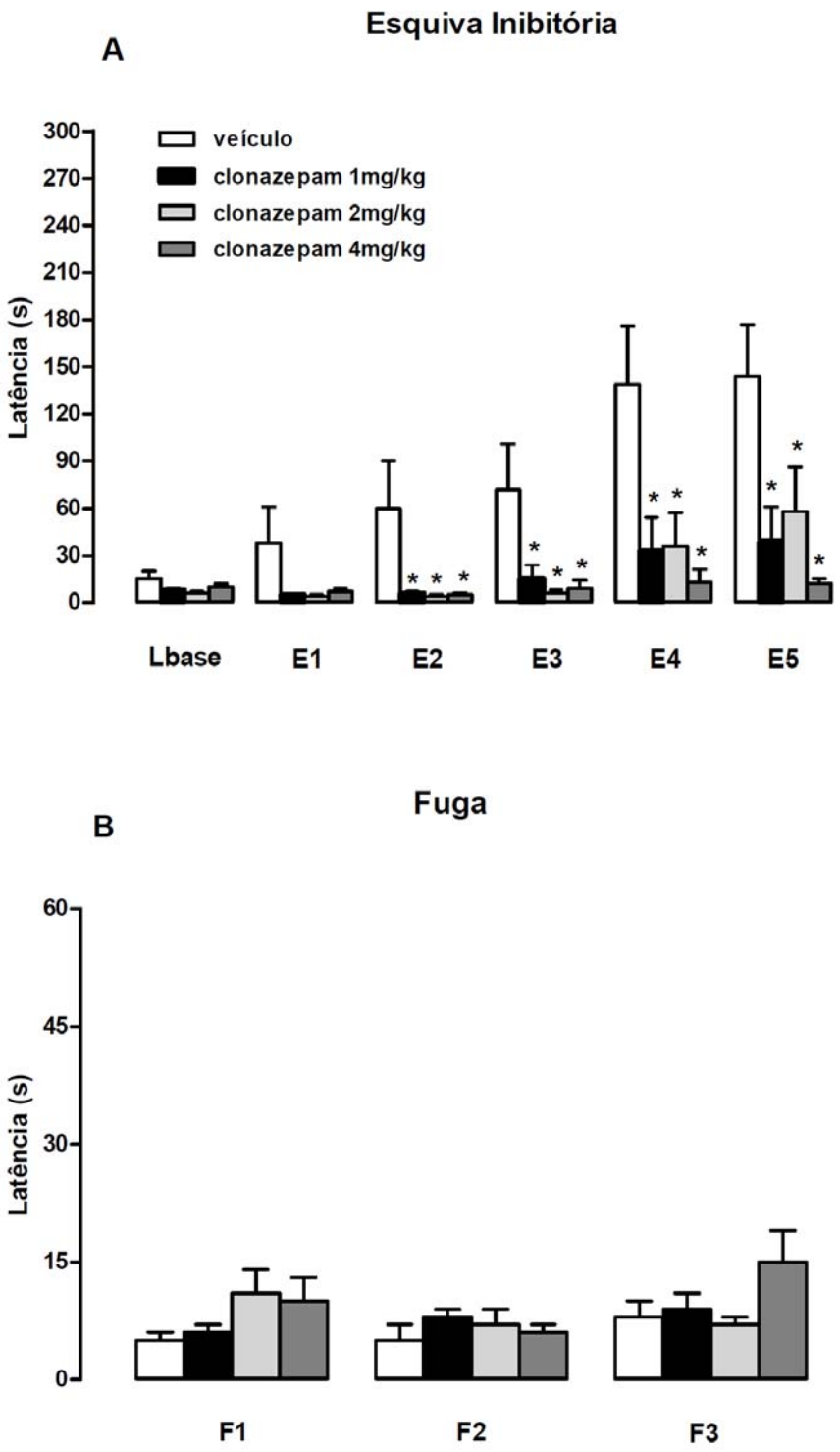

Figura 4 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1, E2, E3, E4 e E5) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à injeção i.p, por 7 dias, de clonazepam * p, 0,05, comparados ao grupo veículo em uma mesma tentativa (n= 12-14 para os grupos).

4.3 - Experimento 1C

Efeito da administração por 14 dias de clonazepam

A figura **5A** mostra o efeito da administração, por 14 dias, de clonazepam sobre o comportamento de esquiva inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostra que a latência de saída dos animais do braço fechado do LTE aumentou ao longo das tentativas, indicando aquisição da resposta de esquiva inibitória [$F(5, 210)= 17,75$; $p < 0,05$]. Além disso, houve efeito do tratamento [$F(3,42)= 6,62$; $p < 0,05$], bem como interação entre os fatores [$F(15,210)= 4,25$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* indica uma diferença significativa nos grupos tratados com clonazepam nas 3 doses nas esquivas 2, 4 e 5 (E2, E4 e E5), em relação ao grupo controle. Adicionalmente a dose de 1mg/kg teve efeito significativo na esquiva 3 (E3).

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito da administração, por 14 dias, de clonazepam sobre a latência de fuga. A ANOVA mostra não que houve o efeito das tentativas [$F(2,84)= 1,23$; $p > 0,05$], do tratamento [$F(3,42)= 1,38$; $p > 0,05$], ou interação entre estes dois fatores [$F(6,84)= 0,78$; $p > 0,05$].

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o clonazepam não alterou a atividade locomotora dos animais [$F(3,42)= 022$; $p > 0,05$].

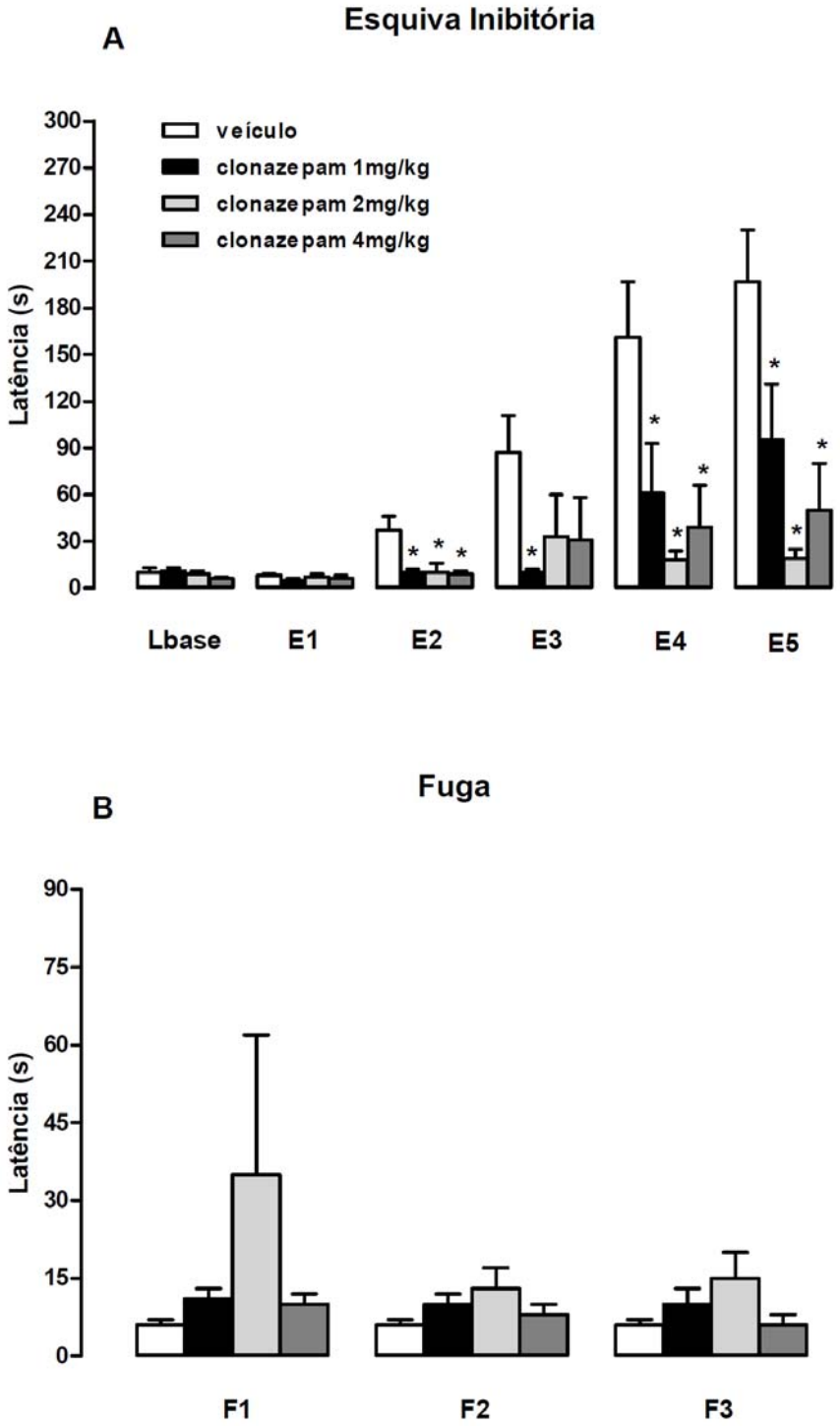

Figura 5 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1, E2, E3, E4 e E5) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à injeção i.p, por 14 dias, de clonazepam. * p, 0,05, comparados ao grupo veículo em uma mesma tentativa (n= 11-12 para os grupos).

4.4 - Experimento 2A

Efeito da administração intra-SCPD de flumazenil

A figura **6A** mostra o efeito da administração de flumazenil sobre o comportamento de esquiva inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostra que a latência de saída dos animais do braço fechado do LTE foi aumentada ao longo das tentativas [$F(2,48)= 16,34$; $p < 0,05$]. Não houve efeito do tratamento [$F(3,24)= 1,53$; $p > 0,05$], nem há uma interação significativa entre os fatores [$F(6,48)= 0,56$; $p > 0,05$].

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito da administração de flumazenil sobre a latência de fuga. A ANOVA mostra que não houve o efeito das tentativas [$F(2,48)= 1,47$; $p > 0,05$], do tratamento [$F(3,24)= 1,16$; $p > 0,05$], ou interação entre estes dois fatores [$F(6,48)= 1,41$; $p > 0,05$].

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o tratamento com flumazenil não alterou a distância percorrida pelos animais [$F(3,24)=0,59$; $p=0,98$].

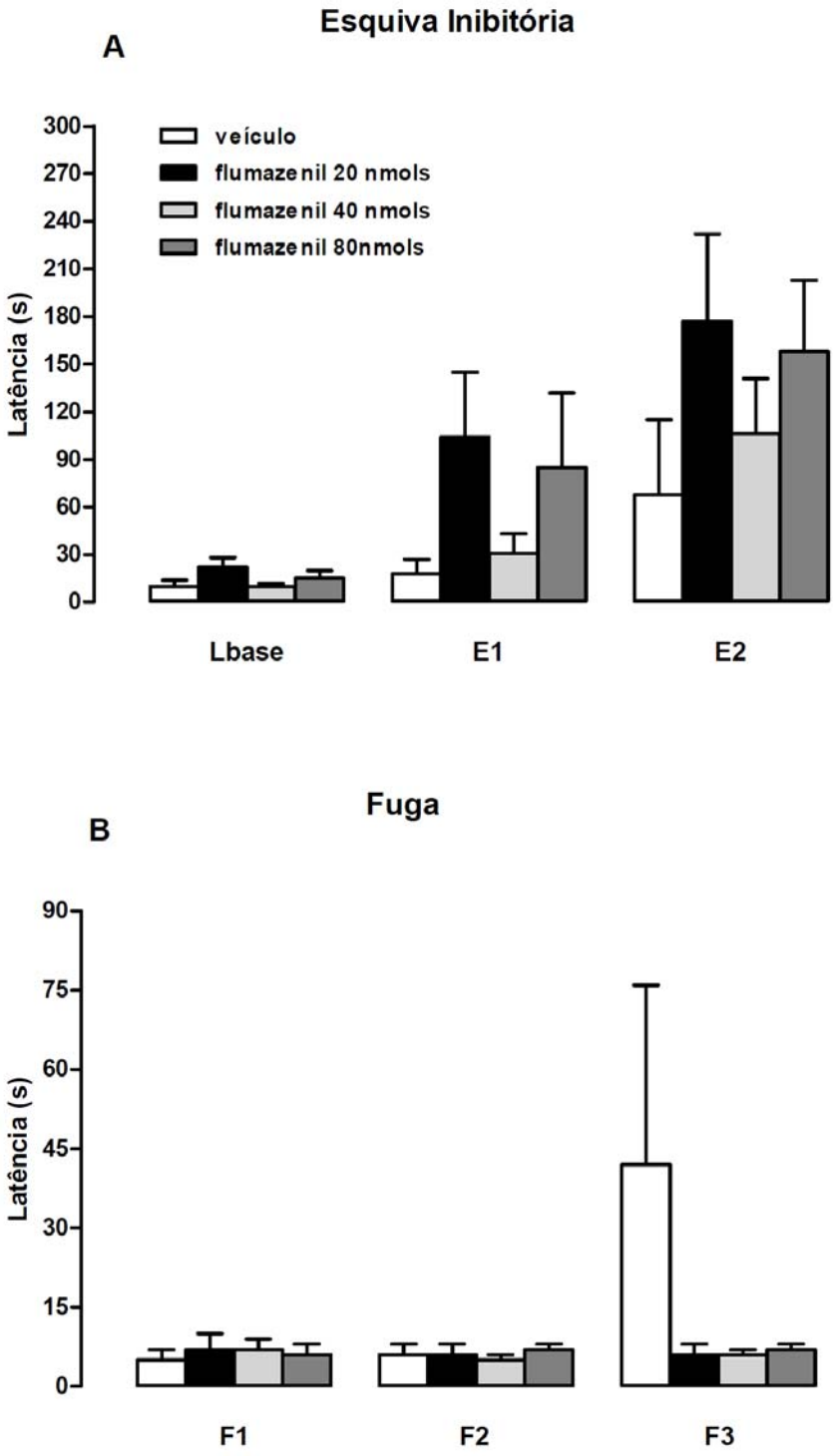

Figura 6 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1 e E2) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à administração intra-SCPD de flumazenil. Não teve efeito significante (n= 11-12 para os grupos).

4.5 - Experimento 2B

Efeito do tratamento agudo com clonazepam em animais injetados intra-SCPD com flumazenil.

A figura **7A** ilustra o efeito do clonazepam sobre as latências de esquiva em animais pré-tratados intra-SCPD com flumazenil. A ANOVA de medidas repetidas da esquiva inibitória mostra que houve efeito significativo das tentativas [$F(2,64)= 9,35$; $p < 0,05$]. Além disso, houve efeito do tratamento [$F(3,32)= 8,22$; $p < 0,05$], bem como interação entre tentativas e tratamento [$F(6,64)= 5,39$; $p < 0,05$]. Conforme descrito no experimento 1A o clonazepam foi capaz de reduzir as latências de esquiva. No entanto, esse efeito não foi bloqueado pela injeção intra-SCPD de flumazenil.

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito sobre as latências de fuga da administração de clonazepam em animais pré-tratados com flumazenil na SCPD. A ANOVA mostra que não houve efeito da tentativa [$F(2,64)= 1,02$; $p > 0,05$], do tratamento [$F(3,32)= 0,70$; $p > 0,05$], bem como não houve interação entre estes dois fatores [$F(6,64)= 1,34$; $p > 0,05$].

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o tratamento com clonazepam não alterou a distância percorrida pelos animais [$F(3,32)= 0,39$; $p = 0,76$].

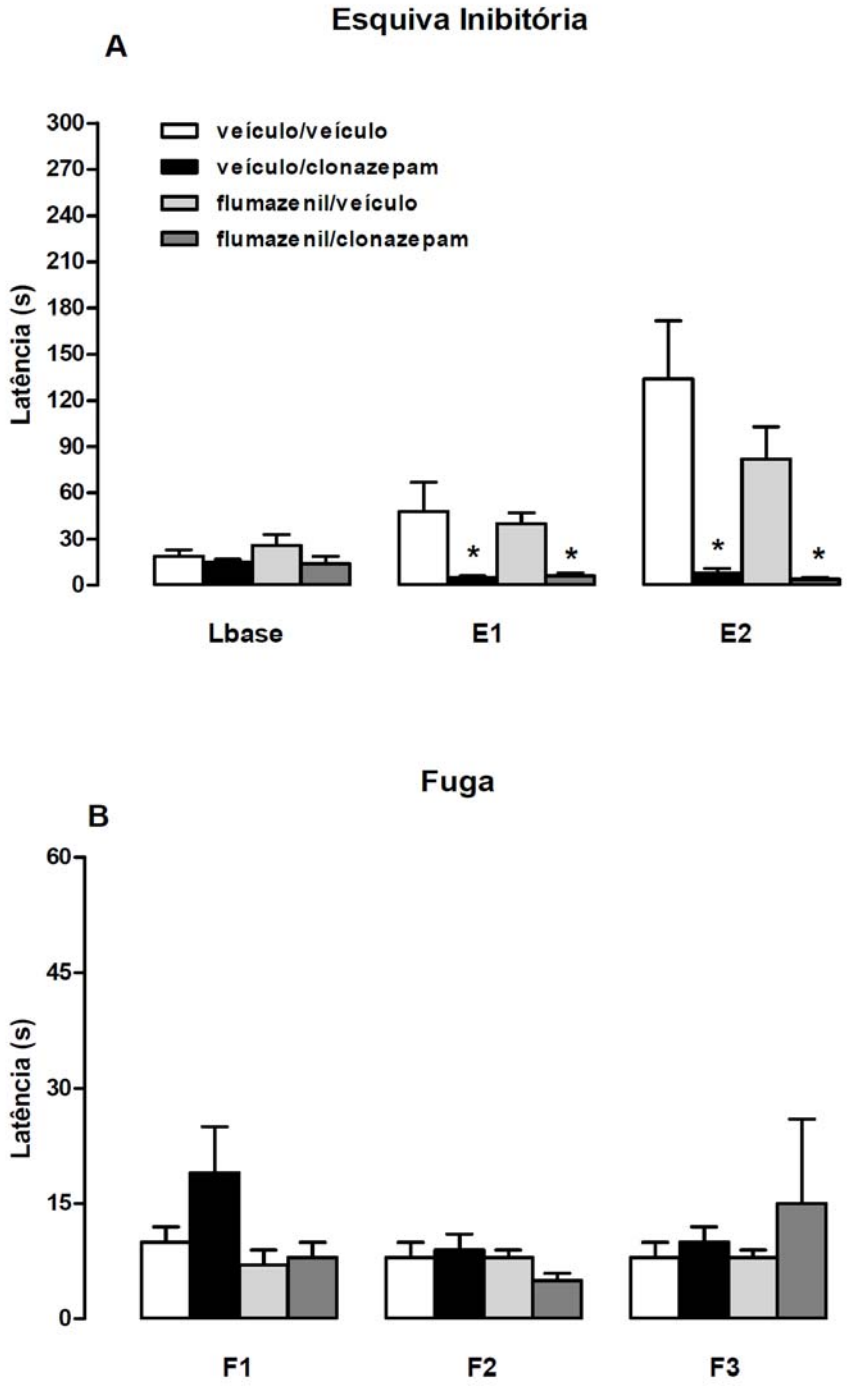

Figura 7 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1 e E2) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à injeção i.p, de clonazepam (4mg/kg), após a microinjeção de flumazenil (20nmols) na SCPD. * p, 0,05, comparados ao grupo veículo em uma mesma tentativa (n= 11-12 para os grupos).

4.6 - Experimento 3

Efeito da administração aguda de clonazepam em animais submetidos ao LTE seguindo procedimento padrão.

A figura **8A** mostra o efeito da administração aguda de clonazepam sobre o comportamento de esquiva inibitória no LTE, medido em 3 tentativas. A ANOVA de medidas repetidas mostra que a latência de saída dos animais do braço fechado do labirinto em T elevado aumentou ao longo das tentativas, indicando aquisição da resposta de esquiva inibitória [$F(2,70)= 16,68$; $p < 0,05$]. Além disso, houve efeito do tratamento [$F(3,35)= 21,57$; $p < 0,05$], bem como interação entre os fatores [$F(6,70)= 19,84$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* indica uma diferença significativa nos grupos tratados com clonazepam nas 3 doses, na linha de base, esquiva 1 e na esquiva 2, em relação ao grupo controle.

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito da injeção aguda de clonazepam sobre a latência de fuga. A ANOVA mostra que não houve efeito da tentativa [$F(2,70)= 1,32$; $p > 0,05$], do tratamento [$F(3,35)= 0,76$; $p > 0,05$], bem como não houve interação entre estes dois fatores [$F(6,70)=1,25$; $p > 0,05$].

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o tratamento com clonazepam não alterou a distância percorrida pelos animais [$F(3,35)= 0,88$; $p = 0,96$].

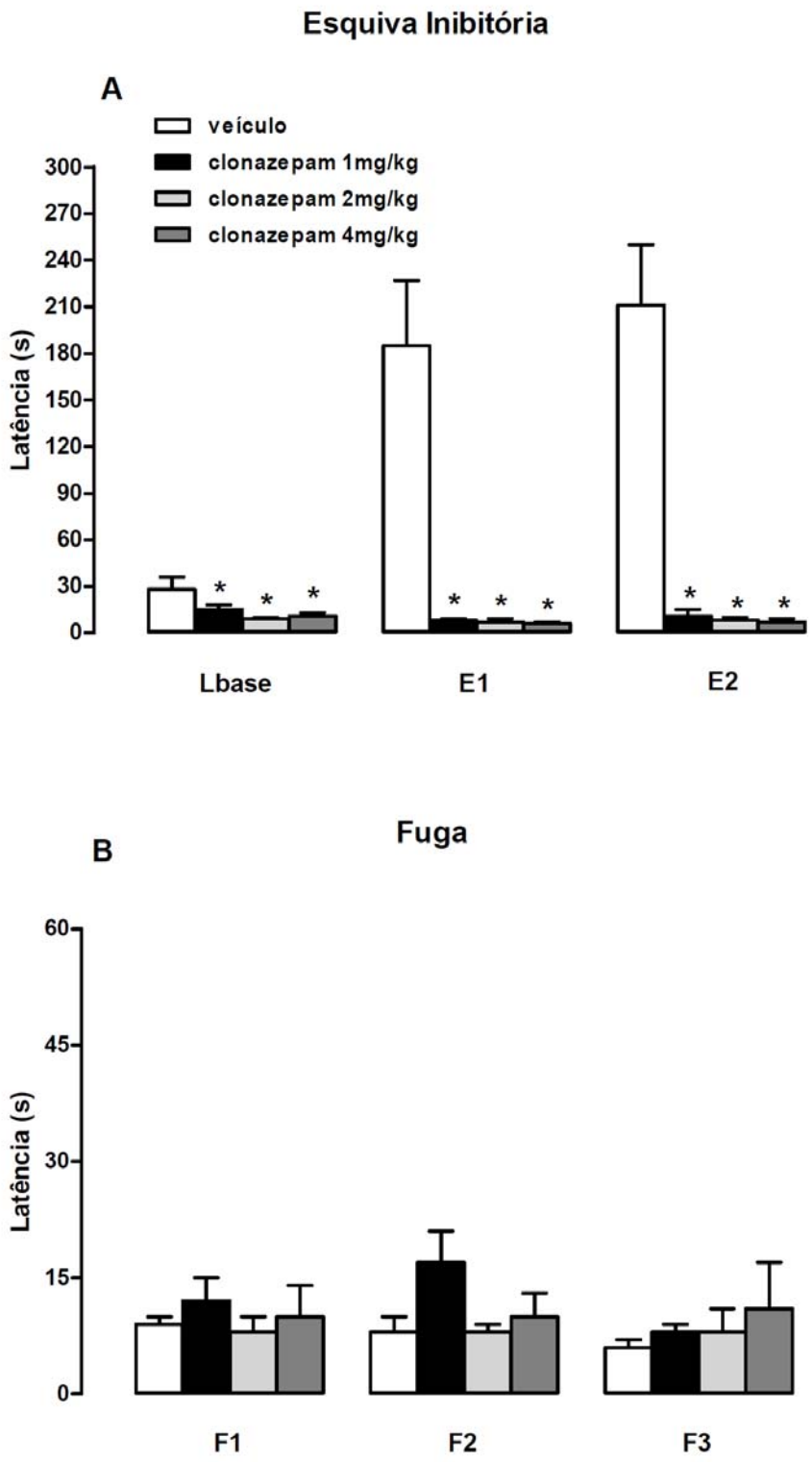

Figura 8 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1e E2) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à injeção i.p, aguda de clonazepam. * p, 0,05, comparados ao grupo veículo em uma mesma tentativa (n= 11-12 para os grupos).

Efeito da administração aguda de clonazepam em animais submetidos ao labirinto em T elevado, com 6 tentativas de esquiva.

A figura **9A** mostra o efeito da administração aguda de clonazepam (4mg/kg) sobre o comportamento de esquiva inibitória, medido em 6 tentativas. A ANOVA de medidas repetidas mostra que a latência de saída dos animais do braço fechado do LTE aumentou ao longo das tentativas, indicando aquisição da resposta de esquiva inibitória [$F(5,70)= 10,77$; $p < 0,05$]. Além disso, houve efeito do tratamento [$F(1,14)= 14,88$; $p < 0,05$], bem como interação entre os fatores [$F(5,70)= 5,47$; $p < 0,05$]. A análise pelo teste *t* de Student indica uma diferença significativa no grupo tratado com clonazepam em relação ao grupo controle nas esquivas 1 a 5.

Na mesma figura (painel **B**) pode ser observado o efeito da administração aguda de clonazepam sobre a latência de fuga. A ANOVA mostra que não houve efeito da tentativa [$F(2,28)= 0,14$; $p > 0,05$], porém houve efeito do tratamento [$F(1,14)= 6,22$; $p < 0,05$], mas não da interação entre estes dois fatores [$F(2,28)= 0,10$; $p > 0,05$]. A análise pelo teste *t* de Student indica uma diferença significativa no grupo tratado com clonazepam nas fugas 1 e 2.

Em relação ao teste do campo aberto, observa-se na tabela 2 que o clonazepam não alterou a atividade locomotora dos animais [$t(14)= 0,30$; $p > 0,05$].

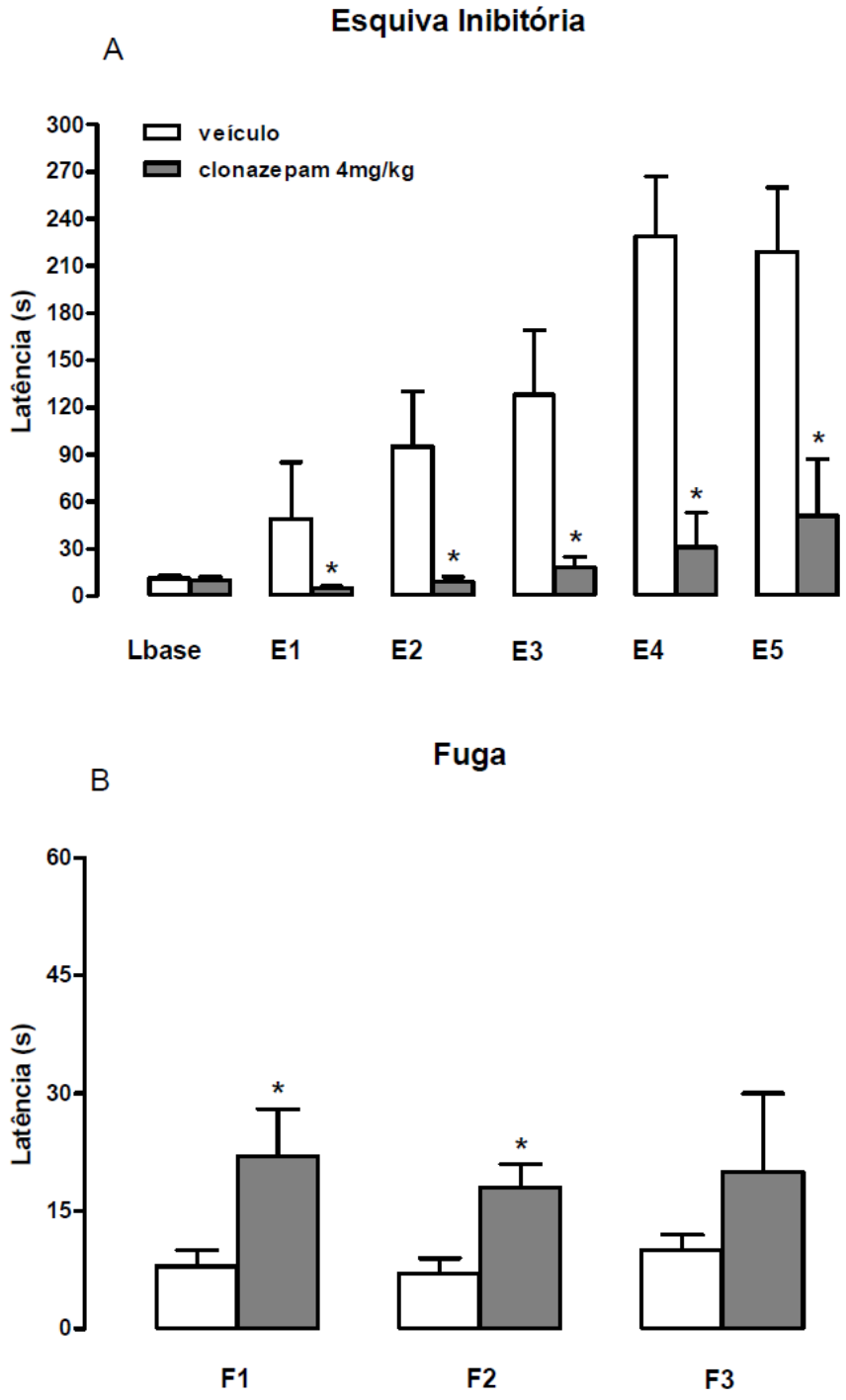

Figura 9 – Média (±EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (Lbase, E1, E2, E3, E4 e E5) e de um dos braços abertos (F1, F2 e F3) de ratos submetidos à injeção aguda de clonazepam i.p. * p, 0,05, comparados ao grupo veículo em uma mesma tentativa (n= 08 para todos os grupos).

Tabela 2 - Média (±EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto realizada pelos animais dos experimentos 1 a 3.

Tratamento		Distância (m)
Experimento 1A (mg/kg)		
Veículo		25,26±3,01
Clonazepam	(1,0)	31,56±3,94
Clonazepam	(2,0)	25,42±8,44
Clonazepam	(4,0)	22,48±4,40
Experimento 1B (mg/kg)		
Veículo		44,48±9,81
Clonazepam	(1,0)	42,11±5,36
Clonazepam	(2,0)	50,54±9,37
Clonazepam	(4,0)	38,62±6,36
Experimento 1C (mg/kg)		
Veículo		43,85±4,06
Clonazepam	(1,0)	47,38±9,04
Clonazepam	(2,0)	40,12±6,25
Clonazepam	(4,0)	40,59±8,48
Experimento 2A (nmols)		
Veículo		35,55±4,59
Flumazenil	(20)	37,50±8,77
Flumazenil	(40)	34,96±1,35
Flumazenil	(80)	35,61±5,40
Experimento 2B (intra SCPD – i.p)		
Veículo/Veículo		36,02±2,78
Flumazenil/Veículo		40,19±3,17
Veículo/Clonazepam		40,47±4,10
Flumazenil/Clonazepam		40,30±4,40
Experimento 3A (mg/kg)		
Veículo		40,17±1,95
Clonazepam	(1,0)	39,15±2,40
Clonazepam	(2,0)	39,00±3,93
Clonazepam	(4,0)	41,43±5,53
Experimento 3B (mg/kg)		
Veículo		42,71±7,29
Clonazepam	(4,0)	39,25±8,89

5. Discussão

No presente trabalho, investigamos o efeito da administração periférica, aguda, ou por 7, ou 14 dias, do agonista de receptores BZD de alta potência clonazepam, com o intuito de estender os estudos de validação farmacológica no labirinto em T elevado (LTE), principalmente no que tange ao efeito de drogas panicolíticas sobre a resposta de fuga.

No experimento 1A, verificamos que uma única injeção sistêmica de diazepam (2mg/kg) não alterou a resposta de fuga do braço aberto do LTE, nem a atividade locomotora mensurada no teste do campo aberto. Nossos resultados estão de acordo com um estudo prévio, realizado por Viana e colaboradores (1994), no qual a administração desta droga ansiolítica (1,2 ou 4mg/kg i.p) não alterou a resposta de fuga neste mesmo modelo. Diferentemente do observado com o diazepam, a administração aguda de clonazepam (1, 2 ou 4mg/kg i.p) aumentou as latências de fuga do braço aberto, sugerindo um efeito panicolítico. Em conjunto, os resultados obtidos estão de acordo com evidências clínicas mostrando que enquanto o diazepam tem pouca relevância no TP, o clonazepam é bastante eficaz (Chouinard, 2004).

A possibilidade do efeito panicolítico do clonazepam ser decorrente do comprometimento da atividade locomotora pode ser contestada, já que no teste do campo aberto esta droga não alterou a distância total percorrida pelo animal. Além disso, analisando os resultados do LTE, o tratamento com clonazepam aumentou as latências de saída do braço aberto, mas reduziu as latências de saída do braço fechado. É importante ressaltar ainda o fato deste tratamento não ter alterado a linha de base do comportamento de esquiva inibitória. Assim, espera-se que o tratamento com drogas que diminuam a

atividade locomotora do animal no LTE aumente o tempo de permanência do animal no braço aberto, bem como no braço fechado, e também aumente a linha de base da esquiva inibitória. Isto não foi observado no presente trabalho.

Os resultados observados com o clonazepam reforçam as evidências obtidas por Jenck e colaboradores (1995) que, utilizando o modelo de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD, relataram que a administração aguda da droga (0,1; 0,56 e 1mg/kg i.p) foi capaz de reduzir, de maneira dose-dependente, a aversão induzida pela estimulação elétrica da SCPD em ratos. Nesta mesma direção, na bateria de teste de defesa do camundongo, o clonazepam (0,3 e 1mg/kg i.p) atenuou a resposta de fuga gerada pela exposição a um predador, o rato (Griebel e colaboradores 1996).

Apesar das discrepâncias nas doses de clonazepam por nós empregadas em relação as que foram utilizadas nestes trabalhos, deve-se ressaltar que um estudo piloto por nós realizado mostrou que doses menores que 1mg/kg foram ineficazes em alterar as respostas defensivas medidas no LTE. Uma possível explicação para estas diferenças na curva dose-resposta deve-se ao fato de estarmos comparando diferentes modelos experimentais.

Ainda em relação à fuga no LTE, nossos resultados indicam que a administração repetida de clonazepam (por 7 ou 14 dias consecutivos) não foi capaz de alterar esta resposta. Deve ser descartada a possibilidade de tais resultados serem resultantes de um mecanismo de tolerância (fenômeno comum a esta classe de droga), pois este tratamento alterou a resposta de esquiva inibitória, conforme será comentado à frente. Este achado contrasta com os resultados obtidos por Griebel e colaboradores (1995), onde o tratamento sistêmico com alprazolam (0,5 - 2mg/kg i.p) por 10 dias

consecutivos, outro benzodiazepínico de alta potência utilizado no tratamento do pânico, foi capaz de alterar as reações de fuga geradas na bateria de teste de defesa em camundongos.

As divergências entre estes estudos mencionados podem ser resultantes de fatores tais quais: as espécies de roedores testados (ratos x camundongos) e diferenças farmacológicas entre as drogas empregadas (alprazolam x clonazepam).

Os resultados por nós obtidos com a administração aguda de clonazepam estão de acordo com evidências clínicas que mostram que o clonazepam é capaz de reduzir o número de ataques e os sintomas apresentados por pacientes com TP (Rosenbaum *et al*., 1997; Moroz *et al*., 2004), bem como, de abolir os ataques de pânico induzidos em humanos pela inalação de dióxido de carbono (Nardi *et al*., 2000). Apesar dos nossos resultados com o tratamento prolongado com clonazepam não apontarem efeito tipo panicolítico, existem evidências clínicas que mostram o efeito antipânico do clonazepam durante o tratamento prolongado. Por exemplo, em estudo longitudinal realizado com pacientes com TP, Worthington e colaboradores (1998) demonstraram que o tratamento com clonazepam por um período de 2 anos foi capaz de reduzir o número de ataques e os sintomas de pânico, de forma semelhante aos que receberam tratamento com antidepressivo. Porém, segundo o grupo de Consenso Internacional sobre Depressão e Ansiedade recomenda-se o uso de benzodiazepínicos de alta potência por um curto período de tempo (no máximo 2 meses) associado a um ISRS, o qual deve ser mantido por um longo período de tempo (Ballenger *et al*., 1998).

Em relação ao comportamento de esquiva inibitória, a administração aguda de diazepam (2mg/kg, i.p) ou de clonazepam (1, 2 ou 4mg/kg, i.p) promoveram a diminuição nas latências de saída do braço fechado, sugestivo de efeito ansiolítico. O efeito do clonazepam sob o comportamento de esquiva inibitória também foi observado após a administração repetida por 7 e 14 dias. Estes resultados estão de acordo com evidências obtidas neste modelo com outras drogas ansiolíticas, benzodiazepínicas ou não, empregadas na clínica para o tratamento do transtorno da ansiedade generalizada (TAG) (Zanoveli *et al*., 2005; Viana *et al*., 1994; Graeff 1998). Por exemplo, estudos realizados por Graeff e colaboradores (1998) mostraram que tanto o agonista parcial de receptores $5HT_{1A}$ buspirona, quanto o diazepam, quando administrados agudamente, apresentam efeito ansiolítico, ou seja, diminuem as latências de esquiva inibitória do braço fechado.

Comparando com evidências obtidas em outro modelo animal de ansiedade, nossos resultados corroboram os achados de Cardoso Vilela e colaboradores (2009) no qual a administração oral de clonazepam (0,5mg/kg) em camundongos, aumentou significativamente a porcentagem de entrada e de tempo de permanência dos animais nos braços aberto do labirinto em cruz elevado (LCE).

Devido à relevância da SCPD na regulação/elaboração de comportamentos relacionados ao pânico, no experimento 2, averiguamos se o efeito do clonazepam sobre a resposta de fuga do braço aberto do LTE poderia ser decorrente da ativação dos receptores benzodiazepínicos localizados nesta estrutura.

Os resultados do experimento 2A mostraram que a administração intra-SCPD do antagonista de receptores benzodiazepínicos flumazenil nas doses de 20, 40 e 80 nmol não alterou as latências de fuga, nem as de esquiva inibitória.

Posteriormente, no experimento 2B, verificamos que, em animais que receberam previamente a administração intra-SCPD de flumazenil, o tratamento agudo com clonazepam ainda foi capaz de reduzir as latências de saída do braço fechado, ou seja, o bloqueio dos receptores benzodiazepínicos presentes na SCPD não foi capaz de antagonizar o efeito do clonazepam.

Este resultado está de acordo com o estudo realizado por Russo e colaboradores (1993) com o modelo do LCE. Estes autores mostraram que a administração de flumazenil intra-SCPD não bloqueou o efeito ansiolítico decorrente da administração aguda de diazepam (i.p). Os autores sugerem duas possíveis explicações para este resultado. A primeira baseia-se no fato de que o volume de droga administrado foi insuficiente para permitir a difusão desta por toda a SCPD. A segunda é a de que outras regiões do sistema nervoso central também estariam envolvidas na ação modulatória dos agonistas benzodiazepínicos (Russo *et al*., 1993). Reforçando esta última idéia, Bueno e colaboradores (2005) mostraram que tanto a administração intra-SCPD do agonista de receptor benzodiazepínico midazolam, do agonista de receptor $GABA_A$ muscimol, quanto do agonista de receptor $GABA_B$ baclofen não alteraram as latências de esquiva inibitória no LTE.

De uma maneira inesperada, no experimento 2B, o tratamento agudo com clonazepam não alterou as latências de fuga, ou seja, por si só o clonazepam não teve efeito. Desta maneira, não conseguimos reproduzir os

resultados obtidos no experimento 1A. Ainda que não sejam claros os motivos para tal ausência de efeito, foi mostrado que a resposta de fuga é dependente da maneira pela qual a aquisição da resposta de esquiva inibitória é realizada, como pode ser observado nos experimentos 3. Neste estudo, observamos que o tratamento agudo com clonazepam foi capaz de alterar a resposta de fuga somente quando o procedimento de esquiva inibitória foi realizado com 6 tentativas.

Neste sentido, tem sido observado que mudanças no protocolo experimental podem gerar diferentes resultados quanto ao efeito de drogas em um dado modelo animal. Por exemplo, no próprio LTE, Teixeira e colaboradores (2000) mostraram que a administração sistêmica de imipramina por 21 dias foi capaz de aumentar a latência de fuga do braço aberto somente após a implementação de uma segunda tentativa de fuga. No procedimento original desenvolvido por Viana e colaboradores (1993) apenas 1 tomada da resposta de fuga era feita. A observação do efeito panicolítico da imipramina decorreu da inclusão do procedimento de confinamento dos animais por 30 minutos ao braço aberto, 24 horas antes do teste. Confirmando estes achados, Poltronieri e colaboradores (2003) mais tarde mostraram que outras drogas utilizadas no TP, como a fluoxetina e a clomipramina, somente apresentam efeito panicolítico no LTE em animais previamente expostos ao braço aberto. É importante ressaltar que neste mesmo trabalho foi observada a ausência de efeito sobre a resposta de fuga de uma droga ansiolítica, sem efeito no TP, a buspirona. Isto ocorreu tanto em animais com ou sem pré-exposição ao braço aberto.

Mudanças como estas também ocorrem em outros modelos experimentais, que não o LTE. Por exemplo, File e colaboradores (1993) observaram no LCE que a administração de drogas benzodiazepínicas, como o diazepam, causa efeito ansiolítico em animais sem experiência prévia com o teste (seja por 5 minutos ou por 10 minutos). No entanto, na reexposição destes, o efeito ansiolítico desta droga foi abolido nos animais testados por 5 minutos, mas não naqueles testados por 10 minutos. Nesta mesma linha de raciocínio, File e Hyde (1978) observaram que no teste de interação social a mudança da intensidade de luminosidade do ambiente pode alterar comportamentos sociais (como: cheirar, limpar e seguir o parceiro) de ratos em uma arena. Tais comportamentos são observados por mais tempo em condições de baixa luminosidade e/ou familiaridade com a arena do que em situações de alta luminosidade e de não familiaridade (File 1980). Por exemplo, File e Hyde (1979) mostraram que a administração sistêmica do benzodiazepínico flurazepam, por 5 dias, foi capaz de aumentar o tempo gasto pelos animais em interação social em condições de baixa luminosidade/familiaridade, efeito ansiolítico. O mesmo não aconteceu quando estes foram submetidos em condições de alta luminosidade/não familiaridade.

Desta forma, os resultados do experimento 3, indicam a necessidade de cautela na análise de resultados da resposta de fuga no LTE, pois, a metodologia empregada neste modelo com 3 esquivas pode gerar resultados falso-negativos.

Tendo em vista os resultados do experimento 2, outros estudos são necessários para se analisar a hipótese de que a administração intra-SCPD de flumazenil é capaz de bloquear o efeito antipânico do clonazepam na tarefa de fuga.

6. Conclusão

Em conclusão, o tratamento agudo com clonazepam foi capaz de aumentar as latências de fuga do braço aberto do LTE, sugestivo de efeito panicolítico e também reduziu as latências de saída do braço fechado, sugestivo de efeito ansiolítico. No entanto, deve ser ressaltado que o efeito panicolítico do clonazepam foi apenas observado após a introdução de uma mudança metodológica no teste do LTE. De uma maneira geral, os resultados obtidos sustentam a associação entre o comportamento de fuga e ataques de pânico.

Referências Bibliográficas

AMERICAN PSYCHIATRYC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th edition, text revision, 2000.

ARBABZADEH-BOUCHEZ S, TYLEE A, LEPINE JP. A European perspective on depression in the community: the DEPRES study. CNS Spectr. 7(2): 120-6, 2002.

AUDI EA, GRAEFF FG. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal grey mediate anti-aversive drug action. Eur J Pharmacol 103(3-4): 79-85, 1984.

BALDESSARINI RS. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, ed 11, Mc Graw Hill, 2006. p. 389.

BALLANGER JC, BURROWS GD, DUPONT RL JR, LESSER IM, NOYES R JR, PECKNOLD JC, RIFKIN A, SWINSON RP. Alprazolam in panic disorder and agoraphobia: results from a multicenter trial. I. Efficacy in short-term treatment. Arch Gen Psychiatry 45(5): 413-22, 1988.

BALLENGER, J.C. Pharmacological treatment of panic disorder. In: DEN BOER, J.A.; STITSE, J.M.A. Handbook of depression and anxiety. New York: Marcel Dekker, 1994, p. 275-289.

BALLENGER JC, DAVIDSON JR, LECRUBIER Y, NUTT DJ, BALDWIN DS, DEN BOER JA, KASPER S, SHEAR MK. Consensus statement on panic disorder from the International Consensus Group on Depression and Anxiety. J Clin Psychiatry. 59(8): 47-54, 1998.

BECKETT SRG ET AL. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT1 receptor agonists administered into the periaqueductal gray. Psychopharmacology 108: 110-14, 1992.

BEITZ, A.J.; CLEMENTS, J.R.; MULLET, M.A.; ECKLUND, L.L. Differential origin of brainstem serotoninergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. J. Comp. Neurol 250: 498-509, 1986.

BEITZ, A.J. Central gray. In: PAXINOS, G. The human nervous system. San Diego: Academic Press, 1990, p. 307-320.

BEITZ, A.J. Periaqueductal gray. In: PAXINOS, G. The rat nervous system. 2. ed., San Diego: Academic Press, 1995, p. 173-182.

BERNIK, M. Relevância medico-social do transtorno do pânico. Revista de Psiquiatria Clínica, 28, 2001. Disponível em http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/28_1/artigos/art05.htm.

BEUCLAIR L. FONTAINE R, ANNABLE L, HOLOBOW N AND CHOUINARD G. Clonazepam in the treatment of panic disorder: A double-blind, placebo-controlled trial investigating the correlation between clonazepam concentrations in plasma a clinical response. Journal of Clinical Psychopharmacology 14: 111-18, 1994.

BUIGUES J, VALLEJO J. Therapeutic response to phenelzine in patients with panic disorder and agoraphobia with panic attacks. J Clin Psychiatry 48(2): 55-59, 1987.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. Annu Rev Psychol 39: 43-68, 1988.

BLANCHARD RJ, YUDKO EB, RODGER RJ, MAGEE LK, BLANCHARD DC. Defense system psychopharmcology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. Behav Brain Res 58: 155-165, 1993.

BLANCHARD RJ, HEBERT MA, DULLOOG L, KAAWALOA N, NISHIMURA O, BLANCHARD DC. Acute cocaine effects on stereotype and defense: an ethoexperimental approach. Neurosci Biobehav Rev 23(2): 179-88, 1998.

BLANCHARD, DC, GRIEBEL G, BLANCHARD RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. Nuerosci Biobehav Rev 25(3): 205-18, 2001.

BRADWEJN J, KOSZYCKI D, ANNABLE L. A dose ranging study of the effect of CCK-4 in healthy volunteers. J Psichiatry Neurosci 16(2): 91-95, 1991.

BROWN C, TANIGUCHI G, YIP K. The monoamine oxidase inhibitor-tyramine interaction. J Clin Pharmacol 29(6): 529-32, 1989.

BUENO CH, ZANGROSSI H JR, NOGUEIRA RL, SOARES VP, VIANA MB. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. Eur J Pharmacol. 516(3): 239-46, 2005.

CAMERON, A.A.; KHAN, I.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-

leucoagglutinin study. II. Descending projections. J. Comp. Neurol 351(4): 585-601, 1995.

CARDOSO VILELA F, SONCINI R, GIUSTI-PAIVA A. Anxiolytic-like effect of Sonchus oleraceus L. in mice. J Ethnopharmacol. 124(2): 325-327, 2009.

CARRIVE P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res 58(1-2): 27-47, 1993.

CAVALJUGA S, LICANIN I, KAPIĆ E, POTKONJAK D. Clomipramine and fluoxetine effects in the treatment of panic disorder. Bosn J Basic Med Sci. 3(3): 27-31, 2003.

CHARNEY, D.S.; WOODS, S.W.; GOODMAN, W.K.; RIFKIN, B.; KINCH, M.; AIKEN, B.; QUADRINO, L.M.; HENINGER, G.R. Drug treatment of panic disorder: the comparative efficacy of imipramine, alprazolam, and trazodone. J. Clin. Psychiatry 47(12): 580-586, 1986.

CHOUINARD G. Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, ad rebound. J Clin Psychiatry 65(5): 7-12, 2004.

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

DE BORTOLI VC, NOGUEIRA RL, ZANGROSSI H Jr. Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. Psychopharmacology (Berl) 198(3): 341-49, 2008.

FILE SE, HYDE JR. Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol. 62(1): 19-24, 1978.

File SE, HYDE JR. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of other minor tranquilisers and of stimulants. Pharmacol Biochem Behav. 11(1):65-69, 1979.

FILE SE. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. J Neurosci Methods. 2(3):219-38, 1980.

FILE SE. Testing new antianxiety agents: pharmacology and biochemistry. In: BURROWS GD, ROTH M, NOYES Jr R. (eds) Handbook of anxiety –The neurobiology of anxiety. Amsterdan: Elsevier Science Publishers, 141-162, 1990.

FILE SE. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT JM, HEAL D, J MARSDEN CA. (eds.) Experimental approaches to anxiety and depression. John Wiley & Sons 25-44, 1992.

FILE SE, ZANGROSSI H JR, VIANA M, GRAEFF FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? Psychopharmacology (Berl). 111(4):491-494, 1993.

GENTIL, V. The aversive system, 5-HT and panic attacks. In: SIMON, P.; SOUBRIÉ, P.; WILDLOCHER, D. Selected models of anxiety, depression and psychosis. Basel: Karger, 1988, p. 142-145.

GODDARD AW, BROUETTE T, ALMAI A, JETTY P, WOODS SW, CHARNEY D. Early coadministration of clonazepam with sertraline for panic disorder. Arch Gen Psychiatry 58: 681-686, 2001.

GRAEFF FG, VIANA MB, TOMAZ CAB. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam, Braz J. Med. Biol. Res 26: 67-70, 1993b.

GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz L Med Biol Res 27(4): 811-29, 1994.

GRAEFF FG, VIANA MB, MORA PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. Neurosci Biobehav Rev 21: 791-799, 1997.

GRAEFF FG, NETTO CF, ZANGROSSI H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. Neurosci Biobehav Rev 23(2): 237-46, 1998.

GRAEFF FG. Ansiedade. In: GRAEFF FG, BRANDAO ML. Neurobiologia da doenças mentais 5a ed. São Paulo: Lemos, 1999, p. 135-178.

GRAEFF FG, DEL BEN CM. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging, Neuroscience & Behavioral Reviews 32(7): 1326-1335, 2008.

GRIEBEL G, SANGER DJ, PERRAULT G. The mouse defense test battery: evaluation of the effects of non-selective and BZ-1 (omega1) selective, benzodiazepine receptor ligands. Behav Pharmacol. 7(6): 560-572, 1996.

HAEFELY WE, MARTIN JR, RICHARDS JG, SCHOCH P. The multiplicity of actions of benzodiazepines receptor ligands. Can J Psychiat 38(4): 102-07. 1993.

HOFER MA. An evolutionary perspective on anxiety. In: ROOSE, SP, GLICK RA (eds). Anxiety as symptom and signal. Analitic Press, Hilsdale, NJ, 1995.

JENCK F, MOREAU JL, MARTIN JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. Psychiatry Res 57(2): 181-91, 1995.

KESSLER RC, CHIU WT, JIN R, RUSCIO AM, SHEAR K, WALTERS EE. The epidemiology of panic attacks, panic disorder, and agoraphobia in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry. 63(4):415-24, 2006.

KLEIN DF. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes, Psychopharmacology 5: 397-08, 1964.

LEPOLA UM, WADE AG, LEINONEN EV, KOPONEN HJ, FRAZER J, SJÖDIN I, PENTTINEN JT, PEDERSEN T, LEHTO HJ. A controlled, prospective, 1-year trial of citalopram in the treatment of panic disorder. J Clin Psychiatry. 59(10): 528-34, 1998.

LIEBOWITZ, M.R.; FYER, A.J.; GORMAN, J.M.; CAMPEAS, R.B.; SANDBERG, D.P.; HOLLANDER, E.; PAPP, L.A.; KLEIN, D.F. Tricyclic therapy of the DSM-III anxiety disorders: a review with implications for further research. J. Psychiatr. Res.**,** 22 (1): 7-31, 1988.

LISTER RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacol. Ther 46: 321-340, 1990.

MARCHESI C, BRUSAMONTI E, GIANNINI A. The use of an emergency ward by patients with depressive or anxiety disorders: a one year follow-up study. *Int J Psychiatr Med*, 31:265–275, 2001.

MARCHESI C, BRUSAMONTI E, BORGHI C. Anxiety and depressive disorders in an emergency department ward of a general hospital: a control study. *Emerg Med J,* 21:175–179, 2004.

MARCHESI C. Pharmacological management of panic disorder. Neuropsychiatr Dis Treat. 4(1):93-106, 2008.

MARKS IM, Fears, phobias, and rituals: panic, anxiety, and their disorders. New York: Oxford University Press, 1987.

MICHELINI S, CASSANO GB, FRARE F, PERUGUI G. Long-term use of benzodiazepines: tolerance, dependence and clinical problems in anxiety and mood disorders. Pharmacopsychiatry 29(4): 127-34, 1996.

MICHELSON D, POLLACK M, LYDIARD B, TAMURA R, TEPNER R, TOLLEFSON G. Fluoxetine panic disorder study group. Continuation treatment of panic disorder after acute response: randomized, placebo-controlled trial with fluoxetine. British Journal of Psychiatry 174: 213-18, 1999.

MONGEAU R, MARSDEN CA Effect of imipramine treatments on the 5HT1A-receptor-mediated inhibition of panic-like behaviors in rats. Psychopharmacology, 131: 321-28, 1997.

MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. J. Comp. Physiol. Psychol. 48: 254-260, 1955.

MOROZ G. High-potency benzodiazepines: recent clinical results. J Clin Psychiatry 65(5): 13-18, 2004.

NARDI AE, VALENÇA AM, NASCIMENTO I, MEZZASALMA MA, ZIN WA. Double-blind acute clonazepam vs. placebo in carbon dioxide-induced panic attacks. Psychiatry Res. 94(2): 179-84, 2000.

NASHOLD JR BS, WILSON WP, SLAUGHTER DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. J Neurosurg., 30(1): 14-24, 1969.

NASHOLD BS JR, WILSON WP, SLAUGHTER DG. The midbrain and pain. In: BONICA JJ (ed.) Advances in Neurology, v.4: International Symposium on Pain. New York, Raven Press, 1974. p.191-196.

NIERENBERG, A.A.; FARABAUGH, A.H.; ALPERT, J.E.; GORDON, J.; WORTHINGTON, J.J.; ROSENBAUM, J.F.; FAVA, M. Timing of onset of antidepressant response with fluoxetine treatment. Am. J. Psychiatry 157: 1423-1428, 2000.

NIES A. Differential response patterns to MAO inhibitors and tricyclics. J Clin Psychiatry. 45(7-2): 70-7, 1984.

PANKSEPP J. Toward a general psychobiological theory emotions. Behav Brain Sci., 5: 407-467, 1982.

PARENTE A. C. B. V, GARCIA-LEAL C, DEL BEN C. M, GUIMARAES F. S. And GRAEFF F. G. "Subjective and neurovegetative changes in healthy volunteers a panic patients performing simulated public speaking", European Neuropsychopharmacology 15(6): 663-71, 2005.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed., San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.

PECKNOLD JC. Discontinuation reactions to alprazolam in panic study disorder. J. Psychiatr. 27 (1): 155–170, 1993.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods, 14(3): 149-67, 1985.

PINHEIRO SN, DEL-BEN CM, ZANGROSSI H JR, GRAEFF FG. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. J Psychopharmacol. 22(2): 132-137, 2008.

POLLACK HM, OTTO MW, WORTHINGTON JJ, MANFRO GG, WOLKOW R. Sertraline in the treatment of panic disorder: a flexible-dose multicenter trial. Arch Gen Psychiatry 55:1010-6, 1998.

POLLACK MH, MARZOL PC. Panic: course, complications and treatment of panic disorder. J Psychopharmacol.,14: 25-30, 2000.

POLTRONIERI, S.; ZANGROSSI JR., H.; VIANA, M.B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. Behav. Brain Res., 147(1-2): 185-192, 2003.

RICKELS K, CASE WG, DOWNING RW, et al: Long-term diazepam therapy and clinical outcome, JAMA 250: 767-771,1983 in LYDIARD RB, ROY-BYRNE PP, BALLENGER JC. Recent advances in the psychopharmacological treatment of anxiety disorders. Hosp Community Psychiatry 39(11): 1157-65, 1988.

ROSENBAUM JF, MOROZ G, BOWDEN CL. Clonazepam in the treatment of panic disorder with or without agoraphobia: a dose-response study of efficacy, safety, and discontinuance. Clonazepam Panic Disorder Dose Response Study Group. J ClinPsychopharmacol 17(5): 390-400, 1997.

RUSSO AS, GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. Psychopharmacology (Berl)., 110(1-2): 198-202, 1993.

SCHENBERG LC, CAPUCHO LB, VATANABE RO, VARGAS LC. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. Psychopharmacology (Berl)., 159(2): 138-144, 2002.

SIMON NM, FISCHMANN D. The implications of medical and psychiatric comorbidity with panic disorder. *J Clin Psychiatry*, 4:8–15, 2005.

STEIN DJ, BOUWER C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. J Anxiety Disord 11(4): 409-429, 1997.

SUSMAN J, KLEE B. The role of high-potency benzodiazepines in the treatment of panic disorder. J Clin Psychiatry 7(1): 5-11, 2005.

TEIXEIRA RC, ZANGROSSI H, GRAEFF FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav., 65(4): 571-576, 2000.

TESAR G.E, ROSENBAUM J.F, POLLACK M.H. Double-Bind, Placebo-Controlled Comparison of Clonazepam and Alprazolam for Panic Disorder. J Clin Psychiatry 52: 69-76, 1991.

TILLER J.W.G; BOUWER C. BEHNKE K. Moclobemide and fluoxetine for panic disorder. Eur Arch Clin Neurosci 249(1): 7-10, 1999.

TRIET D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacol. Biochem. Behav. 44(2): 463-469,1993.

VARGAS, L.C.; SCHENBERG, L.C. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behavioursoftherat. Psychopharmacology, 155(3): 260-268, 2001.

VEENING, J.; BUMA, P.; TER HORST, G.J.; ROELING, T.A.P.; LUITEN, P.G.M.; NIEUWENHUYS, R. Hypothalamic projections to the PAG in the rat: topographical, immuno-electromicroscopical and functional aspects. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical, and neurochemical organization. New York: Plenum Press, 1991, p. 387-415.

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

WALK RD, GIBSON EJ, TIGHE TJ. Behavior of light- and dark-reared rats on a visual cliff. Science.,126(3263): 80-81, 1957.

WESTENBERG HG. Developments in the drug treatment of panic disorder: what is the place of the selective serotonin reuptake inhibitors? J Affect Disord 40(1-2): 85-93, 1996.

WORTHINGTON JJ 3RD, POLLACK MH, OTTO MW, MCLEAN RY, MOROZ G, ROSENBAUM JF. Long-term experience with clonazepam in patients with a primary diagnosis of panic disorder. Psychopharmacol Bull. 34(2): 199-205, 1998.

ZANGROSSI JR, GRAEFF FG. Behavioral validation of the elevated T maze, a new animal model of anxiety. Brain Res Bull, 44: 1-5,1997.

ZANGROSSI H JR, VIANA MB, ZANOVELI J, BUENO C, NOGUEIRA RL, GRAEFF FG. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. Neurosci Biobehav Rev. 25(7-8): 637-645, 2001.

ZANOVELI JM, NETTO CF, GUIMARÃES FS, ZANGROSSI H JR. Systemic and intra-dorsal periaqueductal gray injections of cholecystokinin sulfated octapeptide (CCK-8s) induce a panic-like response in rats submitted to the elevated T-maze. Peptides., 25(11): 1935-1941, 2004.

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

ZORUNSKI, C.F. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. American Journal of Psichiatry 148: 162-173, 1991.