

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

MAYANA CARDOSO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE INIBIDORES DA DNA METILTRANSFERASE NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS AVERSIVOS RELACIONADOS À ANSIEDADE**

VITÓRIA
2017

MAYANA CARDOSO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE INIBIDORES DA DNA METILTRANSFERASE NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS AVERSIVOS RELACIONADOS À ANSIEDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres

VITÓRIA

2017

MAYANA CARDOSO DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE INIBIDORES DA DNA METILTRANSFERASE NA MODULAÇÃO DE
COMPORTAMENTOS AVERSIVOS RELACIONADOS À ANSIEDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres

Aprovada em 15 de dezembro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Profa. Dra. Daniela Amorim Melgaço
Guimarães do Bem
Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. Livia Carla de Melo Rodrigues
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde, proteção e permissão para que eu pudesse concluir esta etapa. Obrigada Senhor, por estar a cada minuto comigo! A Ele toda honra e toda glória.

Agradeço igualmente aos meus pais, sem eles não poderia alcançar meus objetivos.

À minha mãe Eliana! Meu refúgio inesgotável, fortaleza na fé em Deus, dedicação aos seus e minha fonte de amor e paz. Inspiro-me na senhora quando preciso ser forte para continuar a caminhada. Grata a Deus por ser sua filha!

Meu pai Juarez, sinônimo de força, solidariedade, resistência, honestidade e trabalho. O senhor é minha inspiração na construção das minhas conquistas e na luta pelos meus sonhos, e sempre meu “porto seguro”. Tenho muito orgulho do senhor!

Ao meu irmão Juliano, que com sua força e energia, sempre me incentivou a buscar mais conhecimento e ampliar “meus horizontes”. Obrigada pelo estímulo! Você é exemplo de resiliência!

À minha cunhada Licia, por estar sempre por perto e disposta a compartilhar seus conhecimentos comigo. Licia, você é exemplo de que estudar sempre vale a pena!

Aos meus sobrinhos Julia e Otavio, que tiveram que sentir minha ausência quando estava em experimentos nos feriados e fins de semanas ou mesmo estudando. Quero que saibam que são minha alegria e fortaleza. Amo vocês demais!

Ao meu amigo e conselheiro Eduardo Akira Fujiwara. Que pela sua experiência de quem já passou pelo mestrado, me deu conselhos valiosos e ensinamentos que foram fundamentais na minha segurança para seguir em frente. Sem você, tudo seria mais difícil. Muito Obrigada! Desejo-te o melhor da vida!

Aos meus tios: Tia Juvenil e Tio Benedito e a minha prima Daniela, por me receberem sempre tão bem, com todo amor, atenção e carinho na casa de vocês. Muito obrigada!

À minha orientadora Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli, pela orientação, dedicação, paciência, confiança e principalmente pelos conhecimentos compartilhados comigo. Você me mostrou como é admirável fazer o conhecimento e a simplicidade andarem juntos. A você, meu muito obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Juliano Manvailer Martins, pelos ensinamentos, esclarecimentos, disposição em ajudar, paciência, apoio e confiança. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecária: Perla Rodrigues Lôbo – CRB-6 ES-000527/O

O48e Oliveira, Mayana Cardoso de, 1982-
Efeitos de inibidores da DNA metiltransferase na modulação
de comportamentos aversivos relacionados à ansiedade /
Mayana Cardoso de Oliveira. – 2017.
78 f. : il.

Orientador: Valquíria Camin de Bortoli.
Coorientador: Vanessa Beijamini Harres.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. DNA. 2. Transtornos da ansiedade. 3. Pânico. 4. Modelos
animais em pesquisa. I. Bortoli, Valquíria Camin de. II. Harres,
Vanessa Beijamini, 1977-. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

“E não me esquecer, ao começar o trabalho, de me preparar para errar. Não esquecer que o erro muitas vezes havia se tornado o meu caminho. Todas as vezes que não dava certo o que eu pensava ou sentia - é que se fazia enfim uma brecha, e, se antes eu tivesse tido coragem, já teria entrado por ela. Mas eu sempre tivera medo de delírio e erro. Meu erro, no entanto, devia ser o caminho de uma verdade: pois só quando erro é que saio do que conheço e do que entendo. Se a “verdade” fosse aquilo que posso entender - terminaria sendo apenas uma verdade pequena, do meu tamanho. A verdade tem que estar exatamente no que não poderei jamais compreender”.

Clarice Lispector, A paixão segundo G.H.

RESUMO

Os transtornos de ansiedade como o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e o transtorno de pânico (TP) causam impactos significativos na vida dos pacientes por eles afetados. O tratamento farmacológico do TAG e do TP apresenta problemas de eficácia e segurança. Neste sentido, novos alvos farmacológicos têm sido estudados com o objetivo de desenvolver opções mais eficazes de tratamento. A patogênese dos transtornos de ansiedade é de natureza complexa e apresenta interação com fatores ambientais e biológicos, particularmente genéticos. Recentemente, foi mostrado que processos epigenéticos podem influenciar a regulação gênica e mediar a adaptação a fatores ambientais nos transtornos mentais, caracterizado por um fenótipo hereditário estável resultante de alterações no cromossomo sem alterações na sequência do DNA. As modificações epigenéticas incluem mudanças no DNA, como a metilação, que consiste na adição de um radical metil (CH₃), catalisada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Assim, no presente estudo testou-se a hipótese de que o tratamento agudo sistêmico com inibidores da enzima DNA metiltransferase, 5-Aza D e RG 108 nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg, teria efeito do tipo ansiolítico e/ou panicolítico em animais submetidos ao modelo do labirinto em T elevado (LTE) e efeito do tipo ansiolítico no modelo de transição claro-escuro. Nossos resultados mostram que o 5-Aza D na menor dose testada, reduziu a latência da esquiua 1 (E1) no LTE, assim como aumentou o tempo de permanência (%) no compartimento claro e o número de transições no modelo de transição claro-escuro nas duas doses testadas comparadas ao grupo controle, sugerindo efeito do tipo ansiolítico dessa droga. O RG 108 não apresentou efeito estatisticamente significativo no LTE, porém aumentou o tempo de permanência (%) no compartimento claro nas duas doses utilizadas e o número de transições entre os compartimentos claro e escuro na dose de 0,4 mg/kg no modelo de transição claro-escuro, sugerindo efeito do tipo ansiolítico dessa droga nesse modelo. Assim, os resultados do presente estudo sugerem uma possível ação terapêutica dos inibidores de DNA metiltransferase em transtornos de ansiedade.

Palavras-chave: metilação do DNA, ansiedade generalizada, pânico, labirinto em T elevado, teste de transição claro-escuro, inibidores da DNA metiltransferase.

ABSTRACT

Anxiety disorders such as generalized anxiety disorder (GAD) and panic disorder (PT), cause significant impacts on the lives of patients affected by them. Pharmacological treatment of GAD and PT presents problems of efficacy and safety. In this sense, new pharmacological targets have been studied in order to develop more effective treatment options. The pathogenesis of anxiety disorders is complex in nature and interacts with environmental and biological factors, particularly genetic factors. Recently, it has been shown that epigenetic processes can influence gene regulation and mediate adaptation to environmental factors in mental disorders, characterized by a stable hereditary phenotype resulting from changes in the chromosome without changes in the DNA sequence. Epigenetic modifications include changes in DNA, such as methylation, which consists of the addition of a methyl (CH₃) catalyzed enzyme by DNA methyltransferases (DNMTs). Thus, the present study tested the hypothesis that the acute systemic treatment with DNA methyltransferase inhibitors, 5-Aza D and RG 108 at doses of 0.2 and 0.4 mg/kg, would have an anxiolytic-like effect and/or antipanic-like effect in animals submitted to the elevated T-maze and anxiolytic-like effect in the light-dark test. Both ethological models of anxiety. Our results show that 5-Aza D in the lowest dose tested reduced of the inhibitory avoidance 1 (E1) in the elevated T-maze, as well as increased time spent in the light compartment in the light-dark test and the number of transitions in the two doses tested compared to the control group, suggesting an anxiolytic-like effect of this drug. RG 108 had no statistically significant effect on elevated T-maze, but increased time spent in the light compartment at the two doses used and the number of transitions between the light and dark compartments at the dose of 0.4 mg/kg in the light-dark test, suggesting an anxiolytic-like effect of this drug in this model. Thus, the results of the present study suggest a possible therapeutic action of DNA methyltransferase inhibitors in anxiety disorders.

Key words: DNA methylation, generalized anxiety, panic, elevated T-maze, light-dark test, DNA methyltransferase inhibitors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZD	Benzodiazepínicos
CpG	Sítio CpG
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DSM - V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição
EPM	Erro Padrão da Média
E1	Esquiva inibitória 1
E2	Esquiva inibitória 2
F1	Fuga 1
F2	Fuga 2
F3	Fuga 3
FDA	United States Food and Drug Administration
GABA	Gama-aminobutírico
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
ISRSN	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
LB	Latência Basal
LTE	Labirinto em T elevado
OMS	Organização Mundial de Saúde
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
TP	Transtorno de Pânico
5-Aza D	Decitabina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo esquemático do Labirinto em T elevado	21
Figura 2: Estrutura do DNA em diferentes níveis de enovelamento.....	26
Figura 3: Estrutura do DNA em torno de um octâmero de histonas	27
Figura 4: Adição do grupamento metil (CH ₃) ao carbono 5 da citosina.....	28
Figura 5: Estruturas químicas de 5-Aza D e RG 108	30
Figura 6: Incorporação do decitabina ao DNA.....	32
Figura 7: Mecanismo de inibição da DNMT pelo decitabina	33

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1: Labirinto em T elevado.....	41
Fotografia 2: Caixa claro-escuro	42
Fotografia 3: Campo aberto.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da administração intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2, 0,4 mg/kg ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto em animais submetidos ao LTE	52
Tabela 2: Efeito da administração intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2, 0,4 mg/kg ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto em animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro	55
Tabela 3: Efeito da administração intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2, 0,4 mg/kg ou veículo sobre o número de cruzamentos no campo aberto em animais submetidos ao LTE	58
Tabela 4: Efeito da administração intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2, 0,4 mg/kg ou veículo sobre o número de cruzamentos no campo aberto em animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro	61

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=9), 0,4 mg/kg (n=9) ou salina (n=8) sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE.....51
- Gráfico 2: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=10), 0,4 mg/kg (n=10) ou salina (n=10) sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro54
- Gráfico 3: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=10), 0,4 mg/kg (n=10) ou salina (n=10) sobre o tempo (%) de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro54
- Gráfico 4: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=10), 0,4 mg/kg (n=10) ou salina (n=10) sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro55
- Gráfico 5: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=9), 0,4 mg/kg (n=10) ou veículo (n=8) sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE.....57
- Gráfico 6: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=8), 0,4 mg/kg (n=8) ou veículo (n=8) sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro60
- Gráfico 7: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=8), 0,4 mg/kg (n=8) ou veículo (n=8) sobre o tempo (%) de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro60
- Gráfico 8: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=8), 0,4 mg/kg (n=8) ou veículo (n=8) sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro61

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FOTOGRAFIAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	17
1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA E DO TRANSTORNO DE PÂNICO	18
1.3 ESTRUTURAS NEURAI ENVOLVIDAS NA ANSIEDADE E NO PÂNICO	19
1.4 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE	20
1.4.1 Labirinto em T elevado	21
1.4.2 Teste de transição claro-escuro	23
1.5 FATORES EPIGENÉTICOS.....	25
1.5.1 Metilação do DNA	26
1.5.2 DNA metiltransferase	29
1.5.3 Drogas inibidoras da metilação do DNA	30
1.6 FATORES EPIGENÉTICOS EM TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS.....	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 ANIMAIS.....	40
3.2 DROGAS.....	40
3.3 APARELHOS EXPERIMENTAIS	41
3.3.1 Labirinto em T elevado	41
3.3.2 Caixa claro-escuro	42
3.3.3 Campo aberto	43
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	44
3.4.1 Labirinto em T elevado	44

3.4.1.1	Habituação	44
3.4.1.2	Pré-exposição	44
3.4.1.3	Teste no labirinto em T elevado	44
3.4.1.4	Teste no campo aberto.....	45
3.4.2	Modelo de transição claro-escuro	45
3.4.2.1	Habituação	45
3.4.2.2	Teste no modelo de transição claro-escuro.....	45
3.4.2.3	Teste no campo aberto.....	46
3.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	46
3.5.1	Experimento 1: Efeito agudo sistêmico de 5-Aza D sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga em animais submetidos ao LTE	46
3.5.2	Experimento 2: Efeito agudo sistêmico de 5-Aza D em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro.....	47
3.5.3	Experimento 3: Efeito agudo sistêmico de RG 108 sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga em animais submetidos ao LTE	47
3.5.4	Experimento 4: Efeito agudo sistêmico de RG 108 em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro.....	47
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4	RESULTADOS.....	50
4.1	EXPERIMENTO 1: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE 5-AZA D SOBRE AS RESPOSTAS DE ESQUIVA INIBITÓRIA E FUGA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO LTE.....	50
4.2	EXPERIMENTO 2: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE 5-AZA D EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO	53
4.3	EXPERIMENTO 3: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE RG 108 SOBRE AS RESPOSTAS DE ESQUIVA INIBITÓRIA E FUGA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO LTE.....	56
4.4	EXPERIMENTO 4: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE RG 108 EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO	59
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERÊNCIAS.....	71
8	ANEXO.....	78
8.1	ANEXO 1.....	78

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Os transtornos psiquiátricos compreendem uma ampla variedade de alterações e sintomas caracterizados por uma combinação de pensamentos, percepções, emoções e comportamentos anormais, causando impacto significativo na saúde, vida familiar e socioeconômica dos pacientes por eles afetados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os transtornos de ansiedade estão entre os de maior prevalência entre os transtornos psiquiátricos, ficando em 6º lugar a nível global (World Health Organization, 2017).

Os transtornos de ansiedade referem-se a um grupo de transtornos psiquiátricos caracterizados por sentimentos de medo e ansiedade excessivos, incluindo transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno de ansiedade de separação, fobias específicas, mutismo seletivo, entre outros (DSM-V).

De particular interesse para o presente estudo estão dois tipos de transtornos de ansiedade: transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno de pânico (TP). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais em sua quinta edição (DSM-V) publicado em 2014 pela Associação Americana de Psiquiatria, o TAG pode ser definido como um estado de ansiedade e preocupação excessivas (expectativa apreensiva) acerca de diversos eventos ou atividades, ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses. A ansiedade e a preocupação estão associadas com três (ou mais) sintomas como inquietação, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono. Já o TP caracteriza-se por ataques de pânico recorrentes e inesperados. Um ataque de pânico é um surto abrupto de medo intenso ou desconforto intenso que alcança um pico em minutos e durante o qual ocorrem quatro (ou mais) dos sintomas a seguir: palpitações, taquicardia, sudorese, tremores ou abalos, sensações de falta de ar ou sufocamento, sensações de asfixia, dor ou desconforto torácico, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio, calafrios ou ondas de calor, parestesias, sensações de irrealidade ou sensação de estar distanciado de si mesmo, medo de perder o controle ou enlouquecer e medo de morrer.

A proporção da população mundial com transtornos de ansiedade em 2015 foi estimada em 3,6% (264 milhões de pessoas). Sendo mais comuns entre mulheres do que homens (4,6% em comparação com 2,6% a nível global, respectivamente). Na região das Américas, estima-se que 7,7% da população feminina sofram de algum transtorno de ansiedade (homens, 3,6%) (World Health Organization, 2017).

As consequências desses distúrbios em termos de perda de saúde e economia são enormes. No entanto, o investimento atual em serviços de saúde mental é muito inferior ao que é necessário. Sabe-se que cada US\$ 1 investido na ampliação do tratamento de ansiedade, leva a um retorno de US\$ 4 em melhora de saúde e capacidade de trabalho, de acordo com um estudo liderado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que estima pela primeira vez os benefícios na saúde e economia que o investimento no tratamento das formas mais comuns de doença mental como os transtornos de ansiedade podem trazer (World Health Organization, 2017).

Assim, indivíduos que apresentam transtornos de ansiedade como TAG e TP necessitam de acesso a tratamento farmacológico e/ou psicológico que visam melhoras na saúde, vida familiar, convívio social e qualidade de vida destes pacientes.

1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA E DO TRANSTORNO DE PÂNICO

No tratamento para o TAG e TP são empregados fármacos ansiolíticos (benzodiazepínicos) e antidepressivos, como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina (ISRSN), que são os agentes farmacológicos de primeira linha de escolha na maioria das diretrizes de tratamentos atuais. Porém, apesar destes agentes demonstrarem ter uma relação risco/benefício aceitável, possuem certas limitações e efeitos colaterais indesejados. Os antidepressivos apresentam um atraso no início da ação, sendo necessário o seu uso por algumas semanas para induzirem o efeito ansiolítico/panicolítico (KOEN; STEIN, 2011). Já os ansiolíticos, em particular os benzodiazepínicos (BZD), induzem efeitos colaterais indesejáveis, como por exemplo, sedação, amnésia anterógrada e relaxamento muscular. Além disso, apresentam limitações no uso crônico devido à possibilidade de induzirem

tolerância, dependência e de provocarem sintomas de abstinência com a sua retirada (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Neste sentido, novos alvos farmacológicos têm sido estudados com o objetivo de desenvolver opções mais eficazes de tratamento, início de ação mais rápido e que apresentem menos efeitos adversos.

1.3 ESTRUTURAS NEURAIIS ENVOLVIDAS NA ANSIEDADE E NO PÂNICO

Desde o trabalho pioneiro de Charles Darwin publicado em 1972 em seu livro intitulado “A expressão das emoções no homem e nos animais” se inicia o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade. Assim pesquisadores de todo o mundo vêm se esforçando no sentido de identificar os circuitos neurais recrutados em resposta a condições aversivas e reações defensivas em animais e no homem (BRANDÃO et al., 2004).

O conhecimento atual das estruturas envolvidas na regulação da ansiedade baseia-se tanto em evidências clínicas como experimentais obtidas em seres humanos e animais de laboratório (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Desta maneira, Robert e Caroline Blanchard, em um trabalho sistemático, observaram que a confrontação de ratos com predadores levou a caracterização de diferentes estratégias de defesa e que cada estratégia de defesa emitida pelo animal corresponde a uma emoção em humanos (ansiedade, medo ou pânico), cujo substrato neural é específico (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Diferentes estruturas encefálicas estão relacionadas com o pânico e a ansiedade, dentre elas estão a amígdala, hipotálamo medial e a matéria cinzenta periaquedutal, que em conjunto formam o sistema cerebral de defesa (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Neste contexto, é importante conhecer como os genes contribuem para as diferenças das reações de defesa entre indivíduos aos mesmos estímulos aversivos. Enquanto algumas pessoas são excelentes em detectar perigos à sua volta, outras não lhes dão importância. Assim, diferenças de comportamentos de medo entre indivíduos são em larga medida, devido à variação genética (BRANDÃO, 2004).

1.4 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Os primeiros modelos animais de ansiedade foram desenvolvidos com base em paradigmas extraídos da psicologia experimental das décadas de 1950 e 1960 (PINHEIRO et al., 2006).

Assim, os modelos animais de ansiedade vêm sendo desenvolvidos tanto para pesquisa de novos fármacos com potencial ansiolítico, quanto para estudar mecanismos cerebrais subjacentes a transtornos de ansiedade (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; TREIT, 1984).

As classificações clínicas reconhecem a existência de diferentes tipos de ansiedades patológicas, como já mencionado anteriormente, conseqüentemente a ansiedade definida operacionalmente por um determinado modelo animal pode ser diferente da gerada por outros modelos (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998). Por isso a tendência atual é o desenvolvimento de modelos animais específicos para cada tipo de transtorno de ansiedade e esta busca tem sido fundamentada em bases teóricas que abrangem tanto a fisiopatologia do transtorno como os comportamentos que pretendem representá-lo no modelo (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Além disso, muitos modelos de ansiedade utilizados envolvem a aplicação de estímulos nocivos como choque elétrico e privação de alimentos ou água. A privação e a dor podem ser eliminadas usando situações de aversão com base etológica (PELLOW et al., 1985).

Nesse sentido, foram criados modelos que têm como princípio o ponto de vista etológico, o qual baseia-se na aversão natural de roedores a espaços abertos, altos e iluminados (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985) e na propensão do animal em explorar ambientes novos, gerando uma situação de conflito (CRAWLEY; GOODWIN, 1980) como é o caso do labirinto em T elevado e do modelo de transição claro-escuro, que foram utilizados no presente estudo.

1.4.1 Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado (LTE) foi desenvolvido por Frederico Graeff e colaboradores (1993;1994) e deriva do labirinto em cruz elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985) pela obstrução de um dos braços fechados, sendo constituído por dois braços abertos perpendiculares a um braço fechado de iguais dimensões elevados do chão (Figura 1) (GRAEFF; FERREIRA NETTO; ZANGROSSI, 1998; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

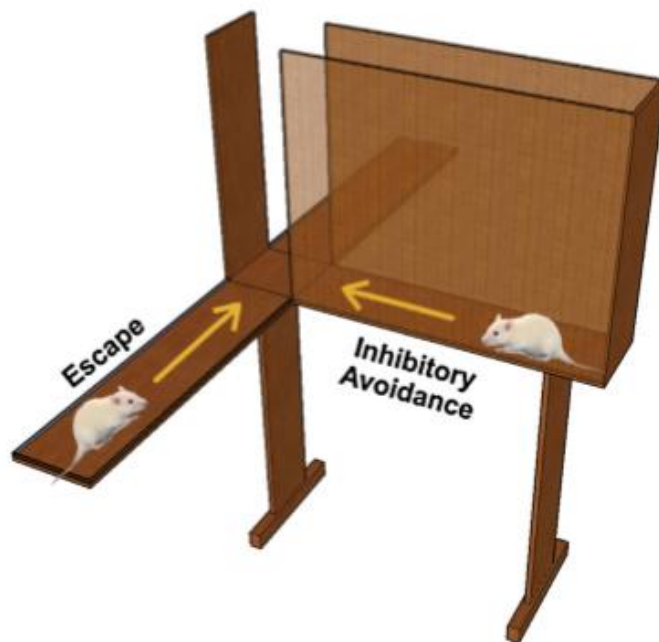


Figura 1: Modelo esquemático do labirinto em T elevado. Fonte: Zangrossi; Graeff (2014).

O LTE foi desenvolvido com a finalidade de testar a teoria dual da participação da serotonina na ansiedade, onde segundo os autores a serotonina facilitaria a ansiedade atuando no complexo amigdalóide e inibiria o pânico agindo na substância cinzenta periaquedutal dorsal (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 1993; GRAEFF et al., 1996; 1997). Este modelo permite medir dois diferentes comportamentos no mesmo animal experimental: a resposta condicionada, ou seja, o medo aprendido representada pela esquia inibitória dos braços abertos e a resposta incondicionada, que seria o medo inato, representada pelo comportamento

de fuga, quando o animal é colocado na extremidade destes braços (GRAEFF et al., 1998; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

Durante o teste no LTE para verificar o comportamento de esquivas inibitórias, o animal é colocado por três vezes consecutivas na extremidade do braço fechado e os tempos de saída deste braço são registrados. Quando colocado no braço fechado, o rato não pode ver os braços abertos até estender a sua cabeça para fora das paredes do braço fechado. A aversão inata de espaços abertos e elevados apresentados por roedores permite que os animais aprendam a se esquivar dos braços abertos quando repetidamente colocados no final do braço fechado do labirinto, assim, a cada tentativa os animais permanecem por mais tempo dentro do braço fechado (VIANA; THOMAS; GRAEFF, 1994; GRAEFF; FERREIRA NETTO; ZANGROSSI, 1998).

Após as tentativas nas quais a esquivas inibitórias é avaliada, os animais são colocados na extremidade distal de um dos braços abertos e é verificado o tempo gasto para a resposta de fuga, ou seja, para sair do braço aberto (VIANA; THOMAS; GRAEFF, 1994; GRAEFF; FERREIRA NETTO; ZANGROSSI, 1998). As respostas de esquivas inibitórias e de fuga têm sido relacionadas, respectivamente, à ansiedade generalizada e ao pânico sugeridas pelo bom critério de predictabilidade ou validação farmacológica que o LTE vem demonstrando desde sua criação (ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

À vista disso, Viana e colaboradores mostraram que a administração do diazepam, um benzodiazepínico com eficácia clínica no TAG, sem efeitos em doses terapêuticas sobre o TP, prejudicou a esquivas inibitórias sem afetar a fuga dos braços abertos no LTE (VIANA; THOMAS; GRAEFF, 1994).

Além disso, a administração crônica da fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) e da clomipramina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) prejudicaram a fuga dos braços abertos, sugerindo um efeito do tipo panicolítico, sem afetar as latências de esquivas. Assim, esses e outros resultados obtidos desde a criação do LTE corroboram a sensibilidade desse modelo na detecção dos efeitos de diferentes drogas com eficácia clínica no TP e no TAG (POLTRONIERI; ZANGROSSI; DE BARROS VIANA, 2003).

1.4.2 Teste de transição claro-escuro

O teste de transição claro-escuro foi descrito inicialmente por Crawley e Goodwin em 1980 e se baseia na visão etológica, na tendência do animal em explorar um ambiente desconhecido. Um estado de conflito ocorre entre a propensão do animal em explorar o ambiente novo e a resposta inata de evitar o desconhecido, assim como um ambiente claro e iluminado (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Deste modo, a área segura é representada pelo pequeno compartimento escuro e a área aversiva pelo compartimento maior que é iluminado (HASCOËT; BOURIN, 2002). Este modelo tem as vantagens da simplicidade de instrumentação, da rapidez e de não possuir protocolos prévios de treinamento dos animais (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).

O modelo original sofreu várias alterações ao longo dos anos, que vão desde mudanças na estrutura do aparelho, como por exemplo, o tamanho da caixa (COSTALL et al., 1988a, 1988b; GAO; CUTLER, 1992; YOUNG; JOHNSON, 1988), até modificações no protocolo experimental, tal como mudança no tempo de duração do teste (SHIMADA et al., 1995).

Medidas de exploração da área iluminada (tempo de permanência, frequência de entradas e locomoção), são utilizadas como índices experimentais de ansiedade, pois a atividade exploratória reflete o resultado combinado dessas tendências em situações novas. Desta forma, no teste de transição claro-escuro, o aumento dos parâmetros de exploração do ambiente iluminado induzido por drogas é sugerido como índice de atividade ansiolítica (HASCOËT; BOURIN, 2002). Os parâmetros mais comumente utilizados neste modelo são a latência para a primeira entrada no compartimento escuro, o número de transições entre os compartimentos e o tempo de permanência no compartimento claro. O tempo gasto em cada compartimento tem sido referido como um reflexo de aversão (BELZUNG; MISLIN; VOGEL, 1987) e o número de transições como um índice de atividade exploratória (COSTALL et al., 1989a, 1989b; CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Já a latência para a primeira entrada no compartimento escuro está envolvida com a inibição do animal (HASCOËT; BOURIN, 1998).

As dimensões típicas da caixa são geralmente um terço para o compartimento escuro e dois terços para o compartimento iluminado e a abertura entre os dois

compartimentos geralmente não ultrapassa sete centímetros (HASCOËT; BOURIN, 2002).

O teste consiste em colocar o animal no centro do compartimento claro, com a face voltada para a passagem para o compartimento escuro. O tempo que o animal leva para cruzar com as quatro patas pela primeira vez a passagem do compartimento claro para o escuro é registrado, e em seguida, são registrados para posterior avaliação o tempo total (%) que o animal permanece no compartimento claro e o número de vezes que faz a transição entre os dois compartimentos durante o período de cinco minutos (CRAWLEY; GODWIN, 1980; COSTALL et al, 1988a, 1988b; GAO; CUTLER, 1992; YOUNG; JOHNSON, 1988; BELZUNG et al., 1987; SHIMADA et al., 1995; MERLO PICH; SAMANIN, 1989; CHAULOFF et al., 1997; HASCOËT; BOURIN, 1998).

Agentes farmacológicos com atividade clínica no TAG como a buspirona, um agonista parcial de receptores 5-HT_{1A}, foram testados no modelo de transição claro-escuro e apresentaram efeito do tipo ansiolítico (SANCHEZ, 1996), assim como os benzodiazepínicos diazepam, alprazolam e o clordiazepóxido (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997; HASCOËT; BOURIN, 1998; MERLO PICH; SAMANIN, 1989). Em contrapartida a imipramina, um antidepressivo tricíclico, não apresentou efeitos na ansiedade no modelo de transição claro-escuro (MERLO PICH; SAMANIN, 1989), porém apresentou efeito do tipo ansiolítico em outro estudo utilizando o mesmo modelo (DE ANGELIS, 1996). Esses resultados mostram efeitos contraditórios de fármacos que atuam sobre a inibição da recaptação de monoaminas no modelo.

1.5 FATORES EPIGENÉTICOS

Em 1905, o geneticista britânico, William Bateson, baseado nos trabalhos de Gregor Mendel, utilizou pela primeira vez o termo “genética” para designar o estudo da hereditariedade e variação dos organismos (BATESON, 2002).

Quatro décadas depois, o embriologista Conrad Waddington, em seus trabalhos publicados entre as décadas de 1940 e 1950, cunhou o termo “epigenética”, por assimilar genética a características adquiridas, propondo uma relação entre genes e desenvolvimento, porém, nenhum mecanismo foi proposto naquele momento (WADDINGTON, 1952, 1942, 1955).

Posteriormente, em 1975, dois estudos distintos, liderados por Arthur Riggs, Robin Holliday e John Pugh sugeriram a metilação do DNA como algo que não causaria alteração na sequência do DNA, que seria influenciado pelo meio ambiente e que poderia ser um importante mecanismo para o controle da expressão gênica em organismos superiores. Foi proposto também que o mecanismo epigenético seria caracterizado pela adição enzimática de um grupamento metil à citosina do DNA de cadeia dupla após a replicação e que entre uma série de funções, proporciona um sistema de codificação de informação além da sequência de nucleotídeos primária (HOLLIDAY; PUGH, 1975; RIGGS, 1975).

Hoje sabe-se que alterações epigenéticas referem-se a mudanças no empacotamento do DNA e na estrutura da cromatina que controla a expressão gênica, sem alteração na sequência original do DNA, conduzindo assim a diferentes fenótipos celulares sem alteração no genótipo (JONES, 2001).

Estudos vêm corroborando o fato de que processos epigenéticos podem influenciar a regulação gênica e mediar à adaptação a fatores ambientais (JAENISCH; BIRD, 2003).

As modificações epigenéticas incluem mudanças covalentes no DNA (metilação) e modificações pós-traducionais nas caudas N-terminais da histona (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação), bem como mecanismos de silenciamento de genes não transcritos (ex.: micro-RNAs) (KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009).

Existe uma infinidade de mecanismos epigenéticos, no entanto, o presente estudo concentra-se apenas na metilação do DNA.

1.5.1 Metilação do DNA

A figura 2 mostra o DNA em diferentes níveis de enovelamento, sendo o cromossomo, o único segmento de DNA que está extremamente compactado, passando pela cromatina, até chegar a dupla hélice, em que o DNA está menos enovelado (ALBERTS et al., 2010).

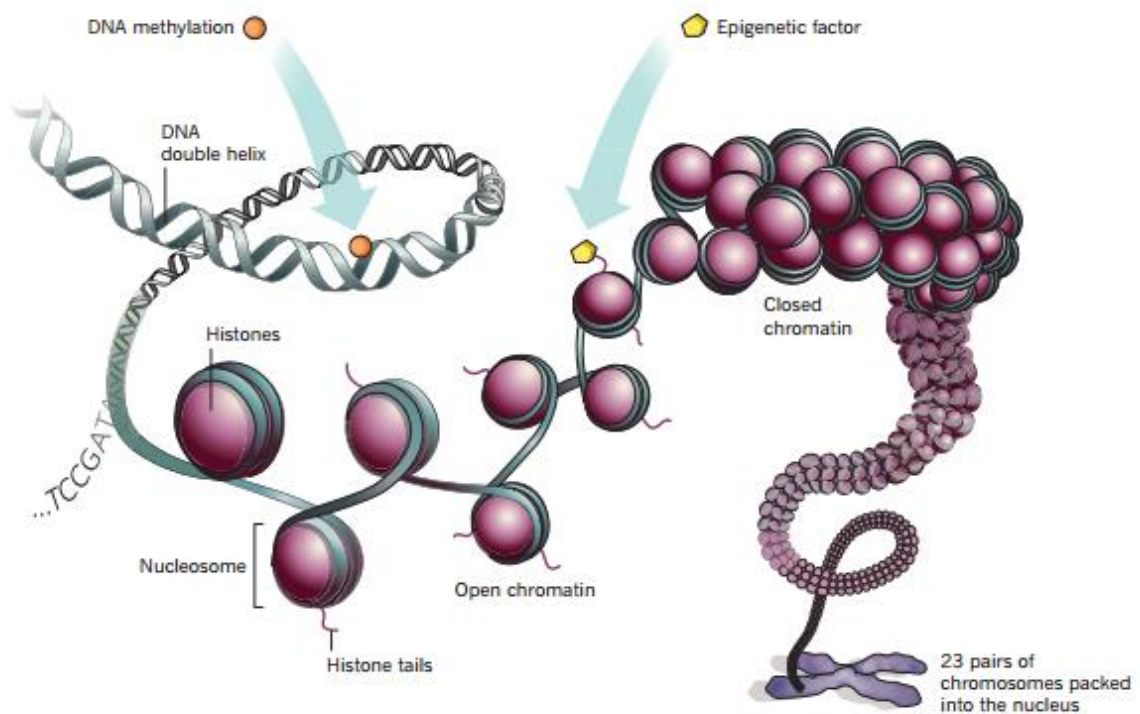


Figura 2: Estrutura do DNA em diferentes níveis de enovelamento. Fonte: Marx (2012).

O DNA é formado por um conjunto de nucleotídeos, que são compostos de açúcares com cinco carbonos, as quais um ou mais grupos fosfato estão ligados, e uma base contendo nitrogênio. O açúcar é uma desoxirribose ligada a um único grupo fosfato, e a base pode ser adenina (A), citosina (C), guanina (G), ou timina (T). A forma na qual as subunidades nucleotídicas estão ligadas confere uma polaridade química à fita de DNA.

A estrutura tridimensional do DNA, a dupla-hélice, é decorrente das características químicas e estruturais de suas duas cadeias polinucleotídicas. Uma vez que essas duas cadeias são mantidas unidas por ligações de hidrogênio entre as bases das

duas fitas, todas as bases estão voltadas para o interior da dupla-hélice, e o esqueleto de açúcar-fosfato encontra-se na região externa (ALBERTS et al., 2010).

A cromatina pode ser diferenciada em duas formas: a eucromatina, que é menos empacotada, permitindo que os fatores de transcrição e outros componentes tenham acesso à região promotora permitindo a transcrição gênica. E a heterocromatina, que é mais compactada, não permitindo assim o acesso à região promotora, não havendo então a transcrição de genes (STUFFREIN-ROBERTS; JOYCE; KENNEDY, 2008).

As esferas vistas na figura 2 são as histonas, proteínas que permitem que o DNA se envolva em torno dela (principal relação proteína - ácido nucleico), formando o nucleossomo, que contém aproximadamente 146 pares de bases de DNA envolvidos em torno do octâmero de histona (MARKS et al., 2001).

Na formação do nucleossomo, primeiro as histonas ligam-se umas às outras para formar os dímeros H3-H4 e H2A-H2B, e os dímeros H3-H4 combinam-se para formar tetrâmeros. Um tetrâmero H3-H4 então se combina a dois dímeros H2A-H2B para formar o octâmero compactado do cerne, ao redor do qual o DNA é enrolado. Cada uma das histonas do cerne possui uma “cauda” N-terminal de aminoácidos que se projeta para fora do cerne histona - DNA. Essas caudas de histonas estão sujeitas a diferentes tipos de modificações covalentes, como é o caso da adição de um grupamento metil (CH₃-), ou seja, a metilação do DNA (ALBERTS et al., 2010). Na figura 3 abaixo aparece com mais detalhes o DNA enrolado em torno do octâmero de histonas e os terminais amino (N) voltados para fora, formando as caudas N-terminais das histonas (TSANKOVA et al., 2007).

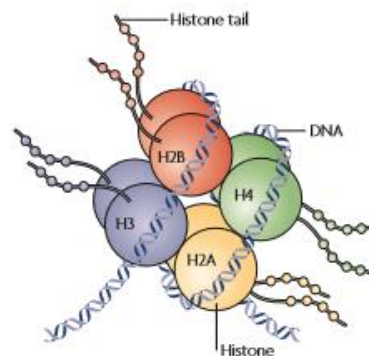


Figura 3: Estrutura do DNA em torno de um octâmero de histonas. Fonte: Tsankova et al. (2007).

De fato, as modificações nas histonas, como a metilação das caudas N-terminais, por exemplo, modula o estado transcricional dos nucleossomos levando ao remodelamento da cromatina, que por sua vez é um processo dinâmico na modulação da expressão gênica (TSANKOVA et al., 2007).

A metilação ocorre de maneira reversível, covalente e pós-translacional, causando mudança no estado transcricional dos nucleossomos, silenciando ou ativando a transcrição gênica. O que vai determinar se ocorrerá silenciamento ou ativação da transcrição de genes será o local onde ocorrerá a adição do grupamento metil (TSANKOVA et al., 2007).

A variação no número de locais passíveis de modificação resulta em inúmeras combinações de modificações (STUFFREIN-ROBERTS; JOYCE; KENNEDY, 2008). Nos tecidos humanos somáticos adultos, a adição do grupamento metil ocorre em locais onde as bases nitrogenadas Citosina (C) e Guanina (G) estão localizadas adjacentes ao esqueleto de DNA, chamados sítio CpG. A metilação ocorre no carbono 5 da citosina (Figura 4).

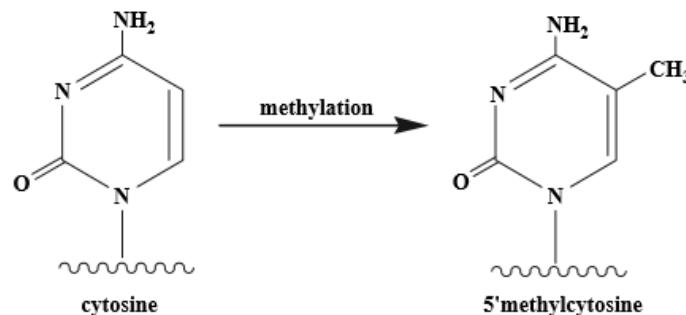


Figura 4: Adição do grupamento metil (CH₃) ao carbono 5 da citosina. Fonte: Kennedy et al. (2008).

O nível de metilação do DNA está associado ao nível de silenciamento gênico, então, uma hipermetilação causará silenciamento de genes, enquanto uma hipometilação resulta em atividade transcricional de genes (STUFFREIN-ROBERTS; JOYCE; KENNEDY, 2008). A metilação das regiões promotoras de alguns genes por DNA metiltransferases (DNMTs) leva ao silenciamento transcricional (SAVICKIENE et al., 2012).

1.5.2 DNA metiltransferase

As reações de metilação do DNA são catalisadas pela enzima DNA metiltransferase (DNMT), que é subdividida em cinco isoformas: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L, porém, apenas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b estão envolvidas diretamente na metilação do DNA em mamíferos, enquanto as outras isoformas atuam como estimuladores catalíticos (OKI; AOKI; ISSA, 2007 (FOULKES et al., 2011)). A isoforma DNMT1 é uma *metiltransferase de manutenção*, que replica o padrão de metilação de um modelo de cadeia parental metilada para uma cadeia filha não metilada (RAZIN; SZYF, 1984) sendo a metiltransferase mais abundante em células somáticas (Robertson et al., 1999). Enquanto as metiltransferases DNMT3a e DNMT3b são consideradas *metiltransferases de novo*, que estabelecem padrões de metilação durante o desenvolvimento (OKANO et al., 1999).

Todas as isoformas de DNMTs são imprescindíveis para o desenvolvimento e diferenciação celular (FOULKES et al., 2011).

Neste sentido, um estudo realizado na Escola de Medicina de Harvard em 1999 mostrou que ratos deficientes em isoformas de metiltransferases DNMT3 apresentavam anomalias e letalidade dentro de semanas após o nascimento (OKANO et al., 1999).

A metilação do DNA vertebrado é restrita aos nucleotídeos de citosina (C) na sequência CG, que faz o pareamento de bases com a mesma sequência (na orientação oposta) na outra fita da hélice de DNA. Consequentemente, um mecanismo simples permite a existência de um padrão de metilação do DNA a ser herdado diretamente pelas fitas-filhas de DNA. A *metiltransferase de manutenção* atua preferencialmente naquelas sequências CG que estão pareadas com uma sequência CG que já está metilada. Como resultado, o padrão de metilação do DNA da fita de DNA parental serve como molde para a metilação da fita-filha de DNA, tornando esse padrão diretamente herdável após a replicação do DNA. A estabilidade dos padrões de herança de metilação do DNA pode ser explicada pelas *metiltransferases de manutenção* do DNA (ALBERTS et al., 2010).

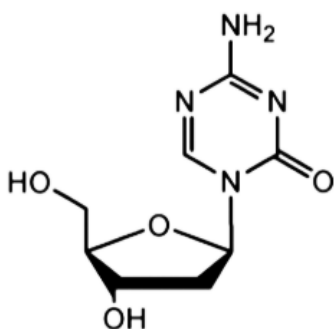
1.5.3 Drogas inibidoras da metilação do DNA

Historicamente, os primeiros compostos que demonstraram atividade de hipometilação de DNA em células eram análogos de citidina: 5-Azacitidina e 2'-Deoxy-5-azacytidine e até hoje continuam sendo estudados por pesquisadores de todo o mundo (FOULKES et al., 2011).

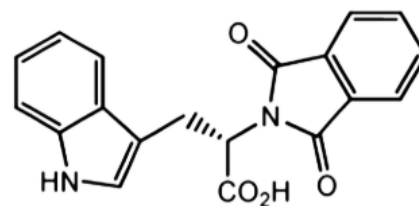
Os inibidores da metiltransferase do DNA, incluindo a 2'-Deoxy-5-azacytidine (decitabina), eram considerados antimetabólitos, mas apresentavam eficácia clínica nas síndromes mielodisplásicas e em certas leucemias quando administrados em doses baixas (CHABNER; LONGO, 2015).

Como consequência dos benefícios clínicos significativos no tratamento da síndrome mielodisplásica (distúrbio pré-leucêmico da medula óssea) e alguns tipos de leucemias (LYKO; STRESEMANN, 2008), a decitabina recebeu aprovação da *Food and Drugs Administration* (FDA) no ano de 2006 (U.S. Food and Drug Administration Home Page).

No presente estudo foram utilizadas duas drogas com ação de inibição da metilação do DNA: o 5-Aza D, um análogo nucleosídeo que pode ser também identificado como 5-Aza-2'-deoxicitidina, decitabina ou 4-Amino-1-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-1,3,5-triazin-2(1H)-one e o RG 108, um inibidor não nucleosídeo da DNA metiltransferase que possui nomenclatura IUPAC referente a *N*-Phthalyl-L-tryptophan (Figura 5).



5 - Aza D



RG 108

Figura 5: Estruturas químicas do 5-Aza D e RG 108. Fonte: Foulks et al. (2011).

O 5-Aza D foi sintetizado pela primeira vez em 1964 e sua potencial atividade antileucêmica foi relatada em 1968, desde então, as pesquisas com esta droga vêm evoluindo e corroborando sua atuação terapêutica tanto no câncer como em outras patologias (JABBOUR et al., 2008).

Estudos laboratoriais e ensaios clínicos mostram que o 5-Aza D induz a hipometilação global, bem como a hipometilação de promotores específicos de genes e ativação da expressão gênica (OKI; AOKI; ISSA, 2007).

Esse fármaco é um análogo de citosina que inibe metiltransferases de DNA. Quando ocorre a metilação do DNA, a DNMT forma uma ligação covalente com o anel de citosina e transfere o grupo metil da S-adenosilmetionina para o anel de citosina. A liberação da DNMT da citosina depende da adição do grupamento metil (OKI; AOKI; ISSA, 2007).

O 5-Aza D é importado pelas células e incorporado ao DNA através da fosforilação por desoxicitidinaquinase, resultando no produto final decitabina trifosfato, que então é integrado ao DNA. Quando o decitabina é incorporado ao DNA, este liga-se de forma covalente com a DNMT, então o grupo N na posição 5' inibe a adição do metil, esgotando assim as células da atividade enzimática, causando a desmetilação do DNA genômico, reativando genes silenciados pela metilação e conseqüentemente promovendo diferenciação celular e como conseqüência as marcas de metilação se perdem durante a replicação do DNA (JACKSON-GRUSBY et al., 1997; JUTTERMANN; LI; JAENISCH, 1994; OKI; AOKI; ISSA, 2007; STRESEMANN; LYKO; STRESEMANN, 2008) como ilustrado nas figuras 6 e 7:

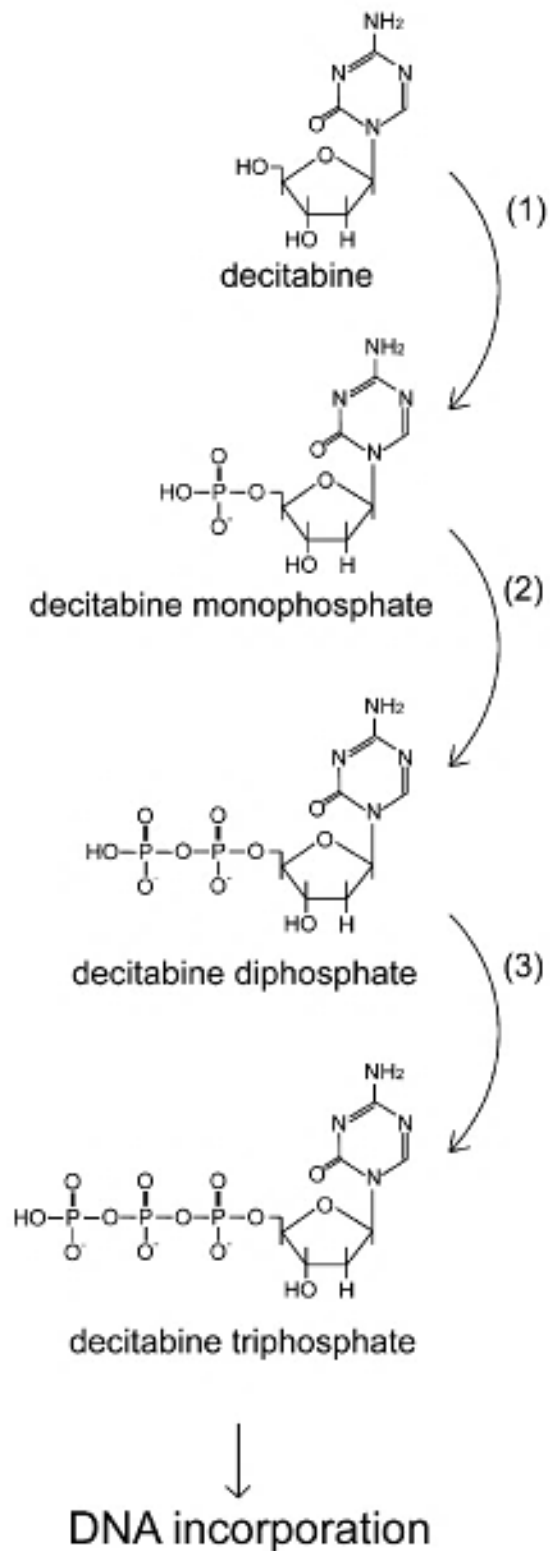


Figura 6: Incorporação do decitabina ao DNA. O decitabina é fosforilado na posição 5, onde o grupo metil é geralmente anexado. Intracelularmente, o decitabina é fosforilado por desoxicitidina quinase, e seu produto final, o decitabina trifosfato é incorporado ao DNA. Fonte: Adaptado de Oki et al. (2007).

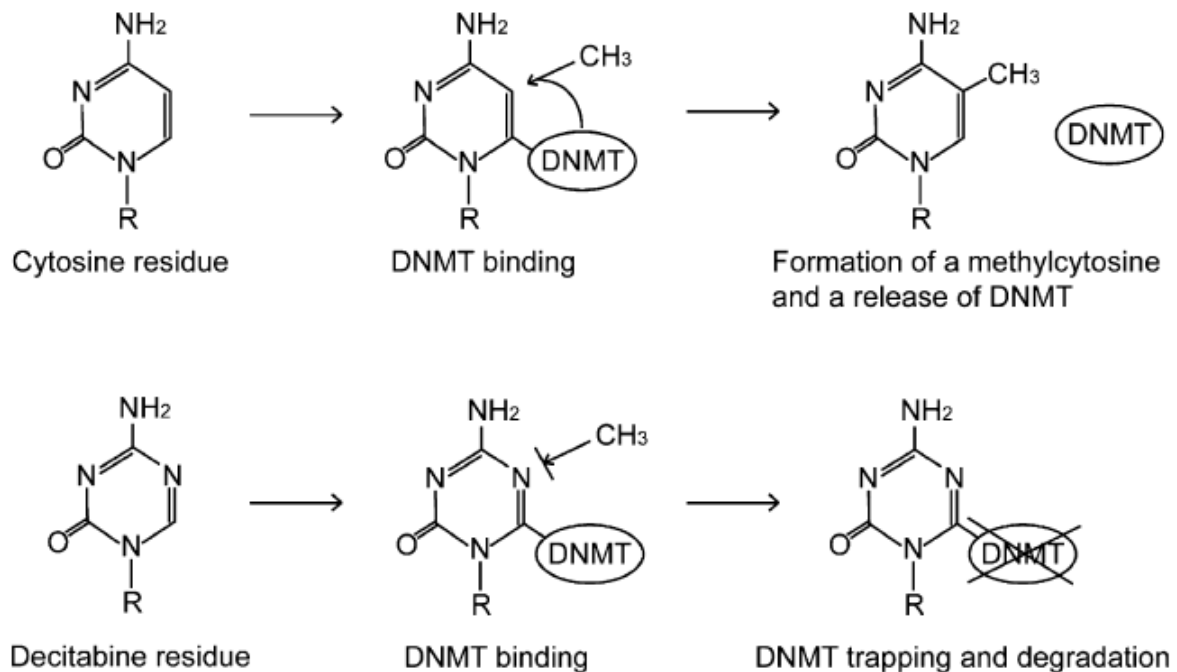


Figura 7: Mecanismo de inibição da DNMT pelo decitabina. Normalmente a DNMT forma uma ligação covalente com o anel de citosina e transfere o grupo metilado da S-adenosilmetionina para o anel de citosina. A liberação de DNMT da citosina depende da adição de grupo metil. Quando o decitabina é incorporado ao DNA, a DNMT forma uma ligação covalente com o anel do decitabina, mas o grupo N na posição 5 impede a adição do grupo metil, evitando assim a metilação. Fonte: Adaptado de Oki et al. (2007).

As potentes atividades de hipometilação do 5-Aza D desaparecem em concentrações mais altas, que resulta em citotoxicidade e diminuição da incorporação da droga no DNA (FOULKES et al., 2011).

Além disso, doses terapêuticas podem apresentar efeitos tóxicos e/ou mutagênicos (CHRISTMAN, 2002; JACKSON-GRUSBY et al., 1997; JUTTERMANN; LI; JAENISCH, 1994), representando uma grande desvantagem na aplicação clínica de 5-Aza D, principalmente a longo prazo (PAWEL SIEDLECKI et al., 2005).

Com relação ao RG 108, este é um inibidor de DNMTs não nucleosídeo com alto potencial de interesse terapêutico que foi descrito como o primeiro inibidor específico da isoforma DNMT1 (ASGATAY et al., 2014) que possui baixa toxicidade e uma significativa ação desmetilante de genes silenciados epigeneticamente. É uma molécula pequena que inibe DNMTs humanas (SAVICKIENE et al., 2012),

bloqueando o sítio ativo da isoforma DNMT1 por uma ligação não covalente (FAHY; JELTSCH; ARIMONDO, 2012).

Por se tratar de uma substância lipofílica, de baixo peso molecular, o RG 108 é constituído por anéis de benzeno, anéis aromáticos heterocíclicos, e muito poucos grupos polares, sendo esperado que seja distribuída rapidamente para o tecido adiposo (BRUECKNER et al., 2005). Ademais, estudos estabelecem um papel importante do grupo carboxi (-COOH) da estrutura do RG 108 na interação com o sítio ativo da enzima DNA metiltransferase (BRUECKNER et al., 2005).

Seu mecanismo de ação ainda não foi sistematicamente elucidado (ASGATAY et al., 2014), porém sabe-se que é capaz de inibir a DNMT do DNA livre, enquanto os análogos nucleosídicos como o 5-Aza D precisam ser incorporados ao DNA.

1.6 FATORES EPIGENÉTICOS EM TRANSTORNOS PSQUIÁTRICOS

Os transtornos psiquiátricos em sua grande maioria compartilham características importantes, incluindo uma substancial predisposição genética (HETTEMA; NEALE; KENDLER, 2001) tal como uma contribuição de fatores ambientais, que por sua vez estimulam a indução de modificações rápidas das histonas no cérebro levando a neuroadaptações duradouras capazes de causar mudanças nos circuitos cerebrais. Sendo assim, a metilação do DNA tem sido implicada na regulação da atividade gênica no cérebro adulto sob condições normais e patológicas (TSANKOVA et al., 2007) e que apresenta um importante papel na regulação da transcrição gênica no sistema nervoso (WEBER; SCHÜBELER, 2007), e na modulação da plasticidade sináptica no encéfalo adulto (COVIC; KARACA; LIE, 2010; LEVENSON et al., 2006). Neste sentido, La Plant e colaboradores descobriram que a expressão de DNA metiltransferase do subtipo DNMT3a foi alterada no núcleo accumbens de ratos pelo estresse da derrota social crônica. Além disso, a inibição da metilação de DNA nessa região encefálica exerceu efeito do tipo antidepressivo, enquanto o aumento de sua expressão foi pró-depressora, mostrando a importância dessas enzimas na regulação comportamental aos estímulos emocionais (LAPLANT et al., 2010).

Além disso, a exposição a diferentes estressores como choque nas patas (MILLER; SWEATT, 2007) e baixo cuidado materno (ZHANG et al., 2010) aumenta a expressão de DNMTs em diferentes regiões encefálicas. Esse evento é

acompanhado por aumento na metilação de DNA e expressão reduzida de genes que regulam a plasticidade sináptica e a neurotransmissão.

Na mesma direção, foi observado que o estresse aumenta a metilação do DNA no hipocampo e em outras regiões encefálicas (MILLER; SWEATT, 2007; ZHANG et al., 2010) e que níveis aumentados de metilação de DNA foram descritos em lócus genômico específico no hipocampo de vítimas suicidas (MCGOWAN et al., 2008; POULTER et al., 2008).

Por outro lado, o estresse induzido pela separação periódica de infantes e mães durante a vida pós-natal precoce em camundongos com idades de 6 semanas, 3 meses e 1 ano causou hipometilação de múltiplos resíduos de CpG na região do hipocampo e núcleo paraventricular hipotalâmico em todas as idades. Estes resultados revelam que experiências estressoras no início da vida desencadeiam uma resposta heterogênea na hipometilação de CpG e contribuem para a origem das condições psiquiátricas ao longo da vida adulta (MURGATROYD et al., 2009).

Recentemente, Joca e colaboradores investigaram os efeitos induzidos pela administração sistêmica ou intra-hipocampal de inibidores da DNA metiltransferase em ratos submetidos a uma série de testes comportamentais e mostraram que houve um efeito do tipo antidepressivo dependente da dose, seguido de aumento de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Esses resultados reforçam a hipótese de que a metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético envolvido no desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo (JOCA et al., 2015).

Entretanto, pouco se conhece sobre o papel da metilação do DNA na etiologia dos transtornos de ansiedade. A patogênese desses transtornos é de natureza complexa e apresenta interação com fatores ambientais e biológicos, particularmente genéticos. Neste sentido, estudos familiares e com gêmeos indicam importante contribuição genética e ambiental para a patogênese do transtorno de pânico, com uma herdabilidade estimada em torno de 48%, sendo os 52% restantes atribuíveis a fatores ambientais (KLAUKE et al., 2010).

Outro estudo em humanos sugere um papel da hipometilação do DNA do gene de monoaminoxidase na patogênese do transtorno do pânico, particularmente em pacientes do sexo feminino, mediando uma influência prejudicial de eventos negativos da vida, uma vez que a ocorrência desses eventos foi associada à metilação relativamente reduzida, enquanto os eventos positivos da vida foram associados ao aumento da metilação (DOMSCHKE et al., 2012). O mesmo grupo de

pesquisa analisou a metilação na regulação da glutamato descarboxilase (GAD1), essencialmente envolvida na síntese de ácido gama-aminobutírico (GABA) em pacientes com transtorno de pânico, visto que uma disfunção do neurotransmissor inibitório GABA foi proposta como o principal processo na patogênese dos transtornos de ansiedade (DOMSCHKE; ZWANZGER, 2008; NEMEROFF, 2003; ROY-BYRNE et al., 2005; ZWANZGER; RUPPRECHT, 2006). O estudo conferiu uma diminuição da metilação do DNA, ativando a transcrição de genes ligados ao GABA, levando ao aumento de seus níveis. Esses resultados podem ser interpretados como uma resposta compensatória da hipometilação do DNA do gene da glutamato descarboxilase no transtorno de pânico (DOMSCHKE et al., 2013). Nesse sentido, a proposta do presente estudo é avaliar um dos mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA, na modulação de comportamentos aversivos relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada e ao pânico em ratos por meio de uma abordagem farmacológica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de inibidores da DNA metiltransferase na modulação de comportamentos aversivos relacionados à ansiedade e ao pânico em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento agudo sistêmico com inibidores de DNA metiltransferase (5-Aza D e RG 108) sobre o comportamento de ratos expostos ao labirinto em T elevado;
- Avaliar o efeito do tratamento agudo sistêmico com inibidores de DNA metiltransferase (5-Aza D e RG 108) sobre o comportamento de ratos expostos ao modelo de transição claro/escuro.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos wistar adultos, provenientes do Biotério Central do Campus de Maruípe da Universidade Federal do Espírito Santo, pesando entre 250-300 gramas, mantidos em caixas comunitárias, contendo no máximo cinco animais por caixa, em temperatura controlada entre $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com livre acesso a água e comida e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com luzes acesas às 7h.

Todos os procedimentos realizados no presente estudo respeitaram os princípios éticos da experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), sob Protocolo nº 060/2014 (ANEXO 1).

3.2 DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas:

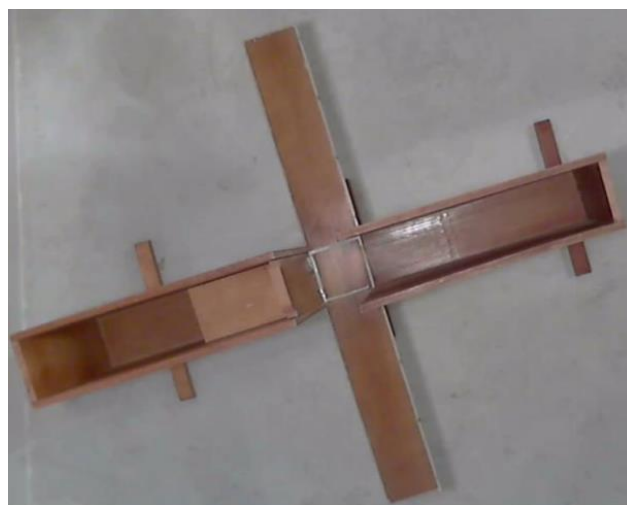
- **5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza D)**: (Sigma-Aldrich®, USA) inibidor nucleosídeo de DNA metiltransferase, nas doses 0,2 e 0,4 mg/kg por via intraperitoneal.
- **RG 108**: (Tocris®, Biosciences, USA) inibidor não nucleosídeo de DNA metiltransferase, nas doses 0,2 e 0,4 mg/kg por via intraperitoneal.

O 5-Aza D foi diluído em salina 0,9% estéril e o RG 108 foi diluído em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e salina 0,9% estéril. As drogas foram administradas no volume de 1 mL/kg.

3.3 APARELHOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Labirinto em T elevado

O aparelho (Figura 8) consiste de três braços de iguais dimensões formando um T, elevado 50 cm do chão, onde os dois braços abertos são perpendiculares a um braço fechado. Estes braços possuem 50 cm de comprimento por 12 cm de largura. As paredes do braço fechado possuem 40 cm de altura e os braços abertos possuem uma régua de proteção de acrílico em toda sua volta de 1 cm de altura para evitar possíveis quedas dos animais durante o teste.



Fotografia 1: Labirinto em T elevado.

3.3.2 Caixa claro-escuro

O aparelho (Figura 9) consiste de uma caixa de madeira com dimensões de 32,0 x 28,5 x 46,0 cm dividida em dois compartimentos. O compartimento escuro tem tampa de madeira, paredes pretas e ocupa um terço de toda a caixa. O compartimento claro, que possui tampa de acrílico e paredes brancas é iluminado pela luz do ambiente e ocupa dois terços de toda a caixa. Entre os dois compartimentos existe uma parede com uma abertura de 7 cm de altura e 7 cm de largura.



Fotografia 2: Caixa claro-escuro.

3.3.3 Campo aberto

O campo aberto consiste de uma caixa quadrada com dimensões de 60 x 60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura e nove quadrantes de 20 x 20 cm cada (Figura 10), utilizada para quantificar a atividade locomotora dos animais após os testes do labirinto em T elevado e teste de transição claro-escuro.



Fotografia 3: Campo aberto.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Labirinto em T elevado

3.4.1.1 Habituação

Para aclimação e habituação ao ambiente experimental, os animais eram levados para a sala de experimentos dois dias antes do teste. A sala experimental possui condições similares às do biotério (ciclo claro/escuro 12/12 horas, com luzes acesas às 7h e temperatura controlada entre $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os animais eram manuseados, individualmente, pelo experimentador durante cinco minutos e em seguida colocados em uma caixa de acrílico com serragem no assoalho por cinco minutos. O mesmo procedimento era repetido no fim da tarde.

3.4.1.2 Pré-exposição

No dia seguinte à habituação, cada animal era exposto individualmente a um dos braços abertos do LTE por trinta minutos. O braço aberto a qual o animal era exposto era isolado do resto do aparato por uma barreira de madeira (50 cm de comprimento por 12 cm de largura) que foi instalada na extremidade proximal do braço.

3.4.1.3 Teste no labirinto em T elevado

No dia seguinte à pré-exposição, os animais foram submetidos ao teste no labirinto em T elevado. Sessenta minutos após a injeção intraperitoneal, para avaliar a resposta de Esquiva Inibitória, cada animal era colocado na parte distal do braço fechado do LTE por três vezes consecutivas, sendo a primeira a Latência Basal (LB) e as duas seguintes a Esquiva Inibitória 1 (E1) e Esquiva Inibitória 2 (E2). O tempo gasto para o animal sair do braço fechado com as quatro patas era cronometrado em cada esquiva e no intervalo entre uma e outra, o animal era colocado por trinta segundos na caixa de acrílico com serragem no assoalho.

Quando terminada a Esquiva 2, o animal era retirado do braço fechado pelo experimentador, colocado na caixa de acrílico por trinta segundos e então começava

a avaliação de resposta de Fuga, em que o animal era colocado na parte distal do braço aberto por três vezes consecutivas, sendo a primeira a Fuga 1 e as duas seguintes a Fuga 2 e Fuga 3. O tempo gasto para o animal sair do braço aberto com as quatro patas era cronometrado em cada fuga e no intervalo entre uma e outra, o animal era colocado por trinta segundos na caixa de acrílico com serragem no assoalho. O tempo máximo de permanência de cada animal, tanto no braço fechado como no braço aberto era de cinco minutos. Quando atingido este tempo limite, o animal era retirado do LTE pelo experimentador, colocado na caixa de acrílico, sendo dada continuidade ao teste. Após o teste com cada animal, o LTE era limpo com álcool a 20%.

3.4.1.4 Teste no campo aberto

Imediatamente após a Fuga 3 no LTE, cada animal era colocado no quadrante central do campo aberto para avaliação da atividade locomotora, que foi medida por meio do número total de quadrantes cruzados pelo animal durante o período de cinco minutos. Após o teste com cada animal, o campo aberto era limpo com álcool a 20%. Todo experimento era filmado por uma câmera (Logitech HD, C270) acoplada ao computador para análise posterior.

3.4.2 Modelo de transição claro-escuro

3.4.2.1 Habituação

Era realizado o mesmo protocolo da habituação do LTE.

3.4.2.2 Teste no modelo de transição claro-escuro

No dia seguinte à habituação, os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro. Sessenta minutos após a injeção intraperitoneal, cada animal era colocado no centro do compartimento claro da caixa, com a face voltada para a passagem para o compartimento escuro. A partir daí, três parâmetros eram avaliados: a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro, que é o tempo que animal levava para atravessar com as quatro patas a passagem para o

compartimento escuro após ser colocado na caixa, caso o animal se mantivesse sem cruzar para o outro compartimento no tempo máximo de cinco minutos, o teste com este animal era excluído. Depois que o animal atravessava a passagem com as quatro patas pela primeira vez, iniciava-se a contagem do número de transições entre os dois compartimentos e o tempo total (%) de permanência no compartimento claro durante o tempo de cinco minutos.

Após o teste com cada animal, a caixa era limpa com álcool a 20%. Todo experimento era filmado por uma câmera (Logitech HD, C270) acoplada ao computador para análise posterior.

3.4.2.3 Teste no campo aberto

Imediatamente após o teste na caixa-claro escuro, cada animal era colocado no quadrante central para avaliação da atividade locomotora, que foi medida por meio do número total de quadrantes cruzados pelo animal durante o período de trezentos segundos.

Após o teste com cada animal, a caixa era limpa com álcool a 20%. Todo experimento era filmado por uma câmera (Logitech HD, C270) acoplada ao computador para análise posterior.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Experimento 1: Efeito agudo sistêmico de 5-Aza D sobre as respostas de esQUIVA inibitória e fuga em animais submetidos ao LTE

Neste experimento foi avaliado se o tratamento com 5-Aza D, um análogo nucleosídeo inibidor de DNA mestiltransferase, apresentaria efeito do tipo ansiolítico e/ou panicolítico nos animais submetidos ao LTE.

Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle, que recebeu salina (n=8), 5-Aza D 0,2 mg/kg (n=9) e 5-Aza D 0,4 mg/kg (n=9). Os animais foram submetidos ao teste do LTE sessenta minutos após a injeção intraperitoneal de 5-Aza D ou salina. As doses de 5-Aza D foram definidas com base em estudo preliminar de Sales et al. (2011).

3.5.2 Experimento 2: Efeito agudo sistêmico de 5-Aza D em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro

Neste experimento foi avaliado se o tratamento com 5-Aza D, um análogo nucleosídeo inibidor de DNA metiltransferase, apresentaria efeito do tipo ansiolítico nos animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro.

Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle, que recebeu salina (n=10), 5-Aza D 0,2 mg/kg (n=10) e 5-Aza D 0,4 mg/kg (n=10). Os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro, sessenta minutos após a injeção intraperitoneal de 5-Aza D ou salina.

3.5.3 Experimento 3: Efeito agudo sistêmico de RG 108 sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga em animais submetidos ao LTE

Neste experimento foi avaliado se o tratamento com RG 108, um inibidor não nucleosídeo de DNA metiltransferase, apresentaria efeito do tipo ansiolítico e/ou panicolítico nos animais submetidos ao LTE.

Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle, que recebeu veículo (solução de DMSO 10% / salina 0,9% estéril) (n=8), RG 108 0,2 mg/kg (n=9) e RG 108 0,4 mg/kg (n=10). Os animais foram submetidos ao teste do LTE, sessenta minutos após a injeção intraperitoneal de RG 108 ou veículo. As doses de RG 108 foram definidas com base em estudo preliminar de Sales e Joca (2015).

3.5.4 Experimento 4: Efeito agudo sistêmico de RG 108 em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro

Neste experimento foi avaliado se o tratamento com RG 108, um inibidor não nucleosídeo de DNA metiltransferase, apresentaria efeito do tipo ansiolítico nos animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro.

Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle, que recebeu veículo (solução de DMSO 10% / salina 0,9% estéril) (n=8), RG 108 0,2 mg/kg (n=8) e RG 108 0,4 mg/kg (n=8). Os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro sessenta minutos após a injeção intraperitoneal de RG 108 ou veículo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados pelo programa de estatística SPSS para Windows® (versão 20.0). Para avaliar o comportamento nas diferentes esquivas do LTE foi empregada uma ANOVA de medidas repetidas (esquiva como medida repetida e tratamento como fator independente). No caso em que houve efeito significativo do tratamento ou interação entre o tratamento e a medida repetida, foi realizada uma ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. O comportamento de fuga no LTE foi analisado por meio da ANOVA de uma via.

Todos os parâmetros no teste de transição claro-escuro e número de cruzamentos no campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo teste de Tukey. O nível de significância usado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE 5-AZA D SOBRE AS RESPOSTAS DE ESQUIVA INIBITÓRIA E FUGA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO LTE

O Gráfico 1A mostra o efeito da administração intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg ou salina (grupo controle) sobre as respostas de esquiva inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que os animais adquiriram a esquiva inibitória dos braços abertos do LTE durante o teste [Fator tentativa: $F(2,23) = 12,357$; $p < 0,001$]. Apesar de efeito marginal no tratamento [$F(2,23) = 3,052$; $p = 0,067$], a ANOVA de uma via revelou que a menor dose de 5-Aza D (0,2 mg/kg) reduziu a latência da esquiva 1 em comparação com o grupo controle [$F(2,23) = 3,734$; $p < 0,05$; *post hoc* de Tukey], sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. No entanto, não foi observada interação significativa entre esquiva e tratamento [$F(4,23) = 1,015$; $p > 0,05$].

Em relação à resposta de fuga (Gráfico 1B), a ANOVA de uma via mostrou que a administração intraperitoneal de 5-Aza D não alterou as três tentativas de fuga no LTE {Fuga 1: [$F(2,23) = 0,513$; $p > 0,05$]; Fuga 2: [$F(2,23) = 1,894$ $p > 0,05$]; Fuga 3: [$F(2,23) = 0,603$; $p > 0,05$]}.}

A Tabela 1 mostra que a administração intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg não afetou a atividade locomotora dos animais se comparado com o grupo salina [$F(2,23) = 0,181$; $p > 0,05$].

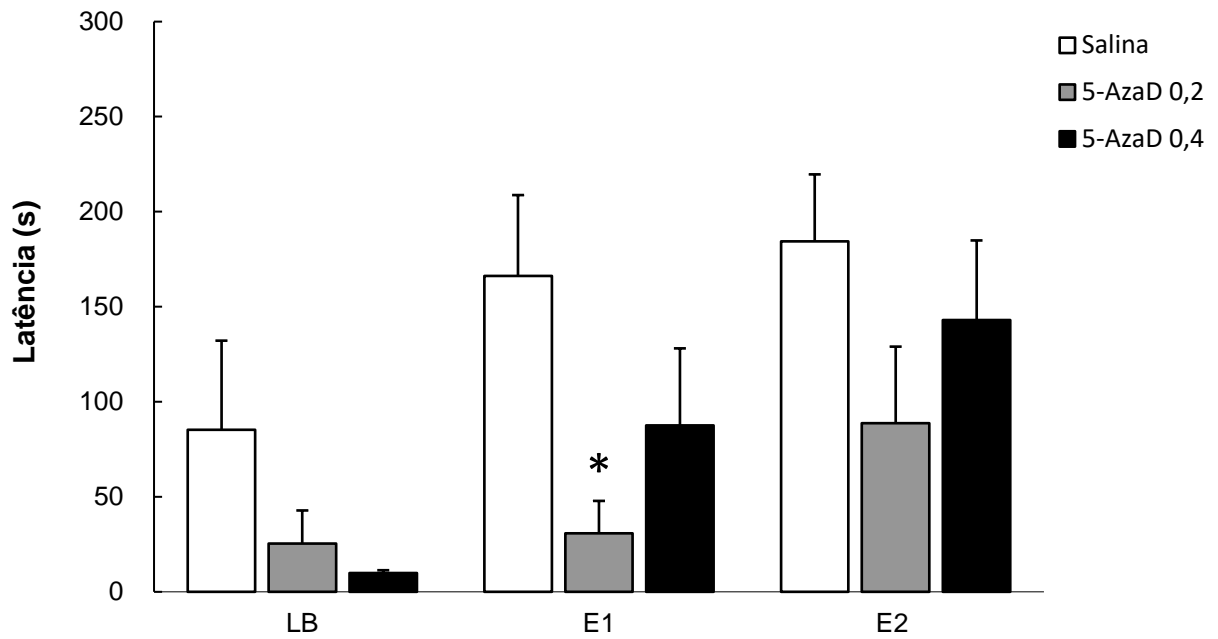
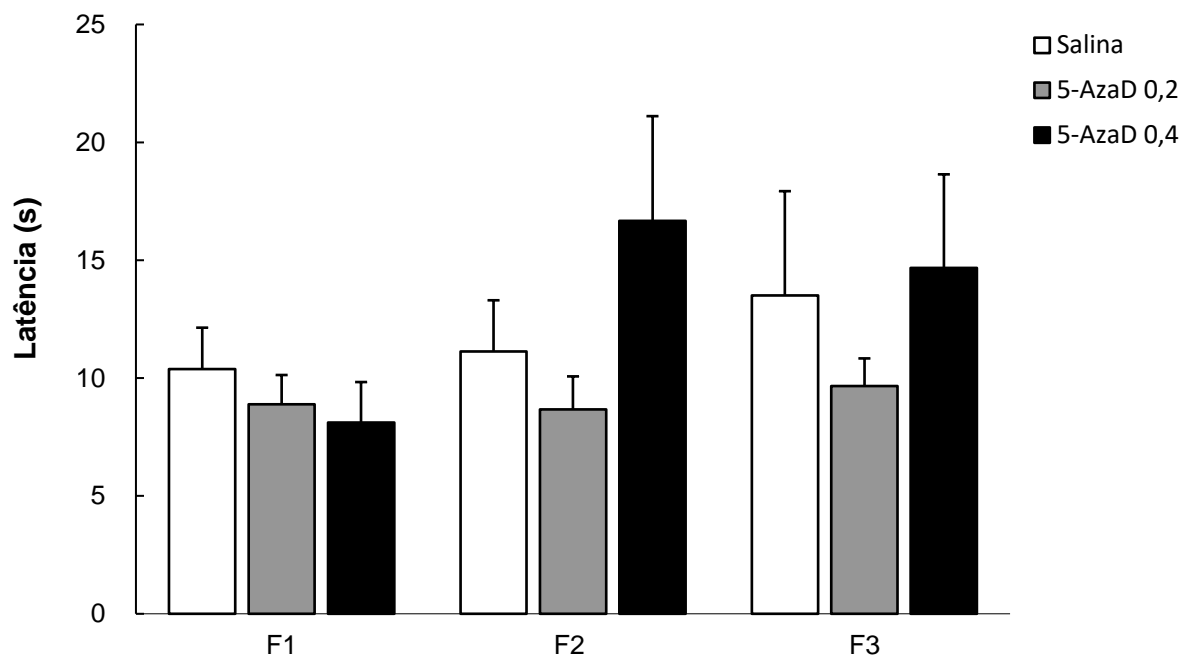
A**B**

Gráfico 1: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/Kg (n=9), 0,4 mg/Kg (n=9) ou salina (n=8) sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE. O 5-Aza D e salina foram administrados 01 hora antes do teste no LTE. Os valores foram expressos pela média \pm EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina na respectiva esquia.

Tabela 1: Efeito da administração intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2, 0,4 mg/kg ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto.

Tratamento	Número de Cruzamentos ^a
Salina	38,88 ± 3,67
5-Aza D 0,2 mg/kg	42,56 ± 3,24
5-Aza D 0,4 mg/kg	41,67 ± 5,78

Nota: ^a Dados representam média ± EPM.

4.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE 5-AZA D EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO

Os gráficos 2, 3 e 4 mostram os resultados obtidos com a administração intraperitoneal de 5-Aza D, nas doses de 0,2 e 0,4 mg/Kg, em comparação a salina (grupo controle) no modelo de transição claro-escuro nas medidas de latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro, no tempo (%) de permanência no compartimento claro e no número de transições entre os compartimentos, respectivamente.

A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo (Gráfico 2) dos tratamentos na latência para a primeira entrada [$F(2,27) = 1,541$; $p > 0,05$]. No entanto, nossos resultados mostram também aumento significativo no tempo (%) de permanência dos animais no compartimento claro na dose de 0,2 mg/kg [$F(2,27) = 28,296$; $p < 0,05$] e de 0,4 mg/kg de 5-Aza D [$F(2,27) = 28,296$; $p < 0,001$], sugerindo efeito do tipo ansiolítico (Gráfico 3).

Como pode ser observado no Gráfico 4, a ANOVA de uma via revelou que houve aumento significativo no número de transições entre os compartimentos claro e escuro dos animais tratados com 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg [$F(2,27) = 8,256$; $p < 0,01$] e 0,4 mg/kg [$F(2,27) = 8,256$; $p < 0,01$] em comparação com a grupo salina, o que sugere um efeito do tipo ansiolítico das duas doses nesse parâmetro.

A Tabela 2 mostra que o tratamento com 5-Aza D não alterou a atividade locomotora dos animais quando comparado com o grupo controle [$F(2,27) = 0,471$; $p > 0,05$].

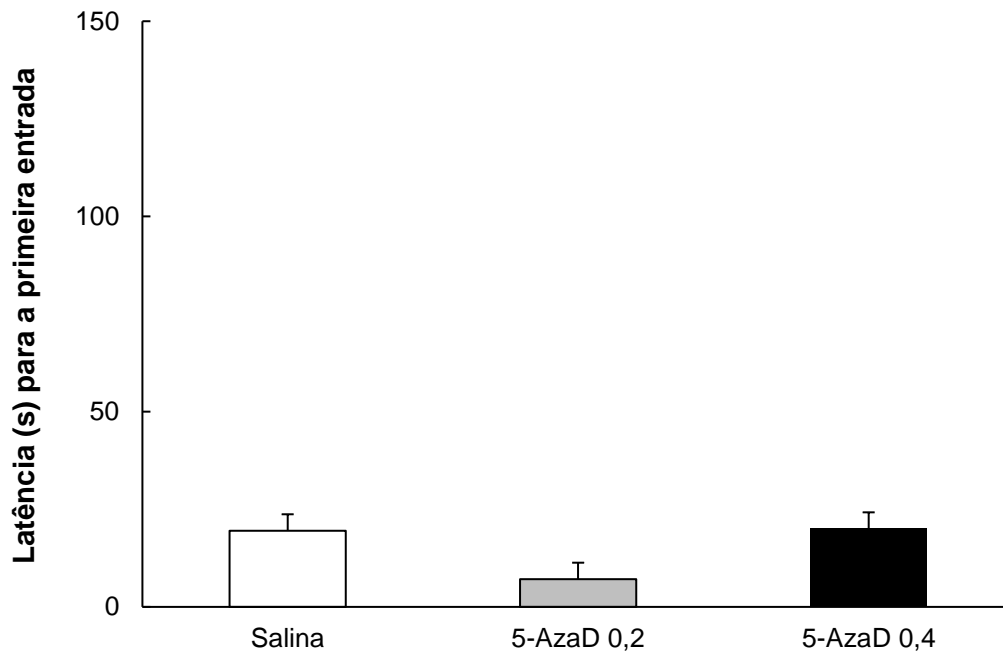


Gráfico 2: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=10), 0,4 mg/kg (n=10) ou salina (n=10) sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média ± EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

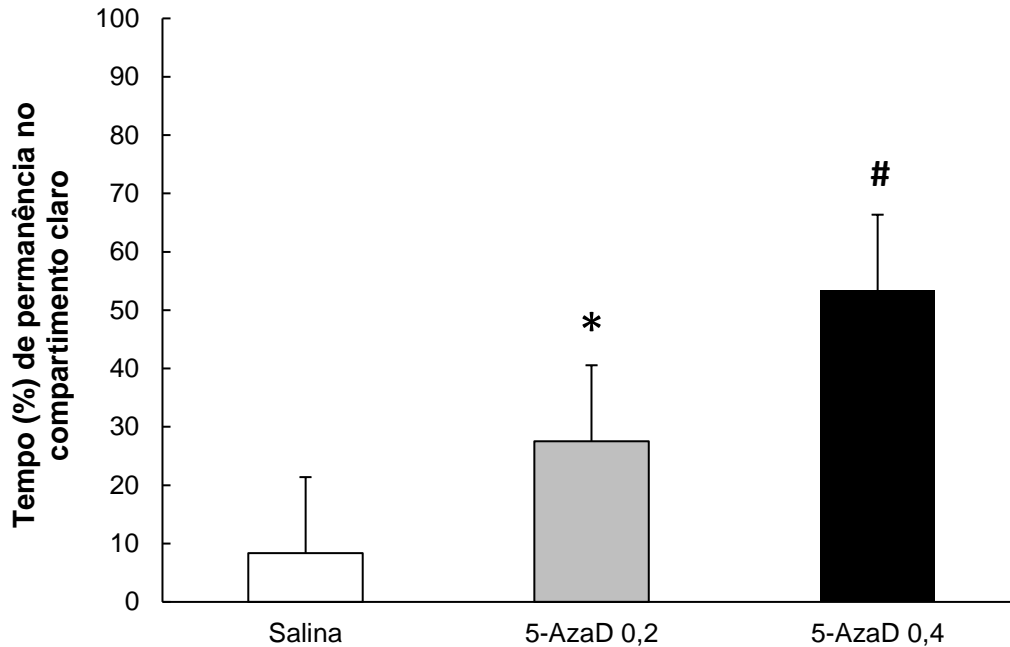


Gráfico 3: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=10), 0,4 mg/kg (n=10) ou salina (n=10) sobre o tempo de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média ± EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. # $p < 0,001$ comparado ao grupo salina.

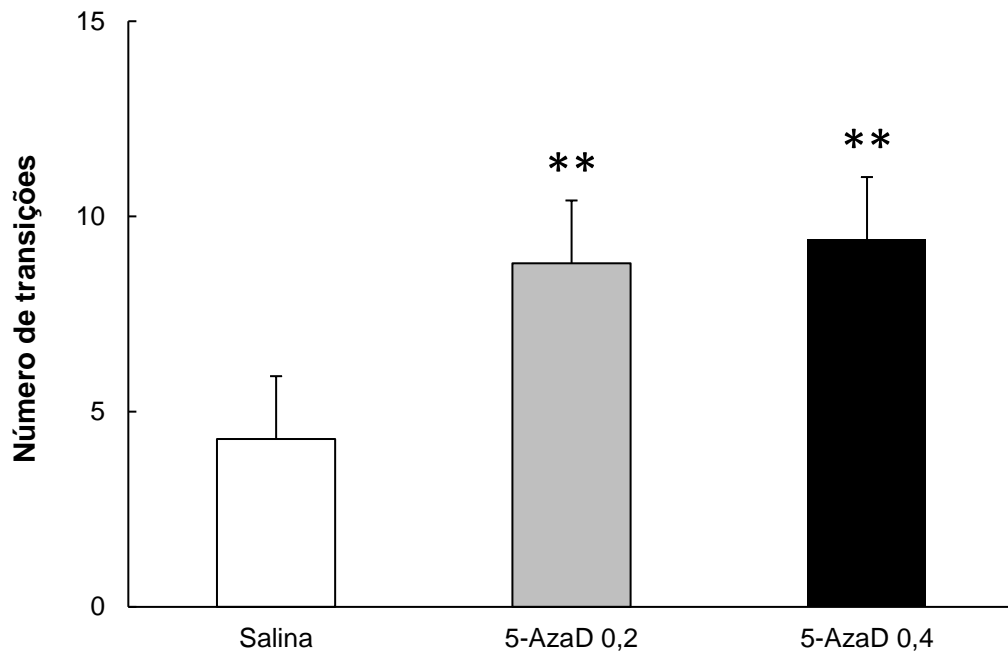


Gráfico 4: Efeito da injeção intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2 mg/kg (n=10), 0,4 mg/kg (n=10) ou salina (n=10) sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média \pm EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

** $p < 0,01$ comparado ao grupo salina.

Tabela 2: Efeito da administração intraperitoneal de 5-Aza D nas doses de 0,2, 0,4 mg/Kg ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto.

Tratamento	Número de Cruzamentos ^a
Salina	42,30 \pm 4,84
5-Aza D 0,2 mg/kg	48,30 \pm 5,16
5-Aza D 0,4 mg/kg	45,90 \pm 2,83

Nota: ^a Dados representam média \pm EPM.

4.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE RG 108 SOBRE AS RESPOSTAS DE ESQUIVA INIBITÓRIA E FUGA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO LTE

O gráfico 5A mostra o efeito da administração intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg, 0,4 mg/kg ou veículo (grupo controle) sobre as respostas de esquiva inibitória. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que ocorreu aquisição de aprendizagem da esquiva inibitória durante o teste [Fator tentativa: $F(2,24) = 20,039$; $p < 0,001$]. Porém, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(2,24) = 0,672$; $p > 0,05$], nem da interação da esquiva e tratamento [$F(4,24) = 0,429$; $p > 0,05$].

Em relação à resposta de fuga (Gráfico 5B), a ANOVA de uma via mostrou que a administração intraperitoneal de RG 108 nas doses utilizadas não alterou as três tentativas de fuga no LTE {Fuga 1: [$F(2,24) = 0,322$; $p > 0,05$]; [Fuga 2: [$F(2,24) = 0,253$; $p > 0,05$]; [Fuga 3: [$F(2,24) = 0,079$; $p > 0,05$]}.

A Tabela 3 mostra que o tratamento com RG 108 não alterou a atividade locomotora dos animais quando comparado com o grupo controle [$F(2,24) = 2,076$; $p > 0,05$].

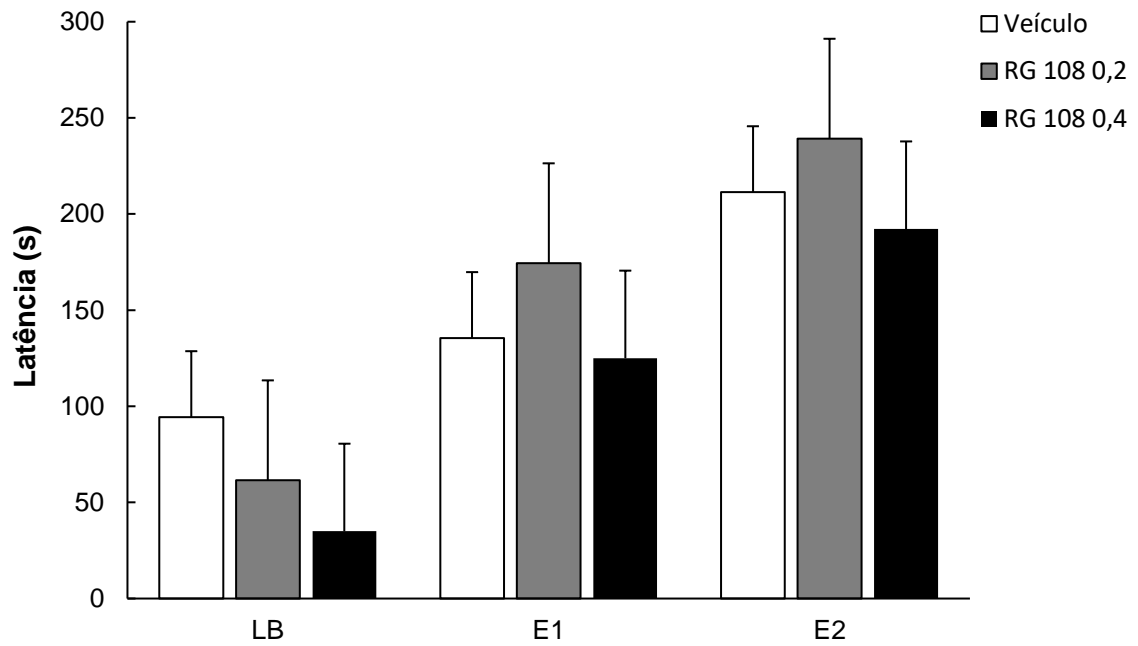
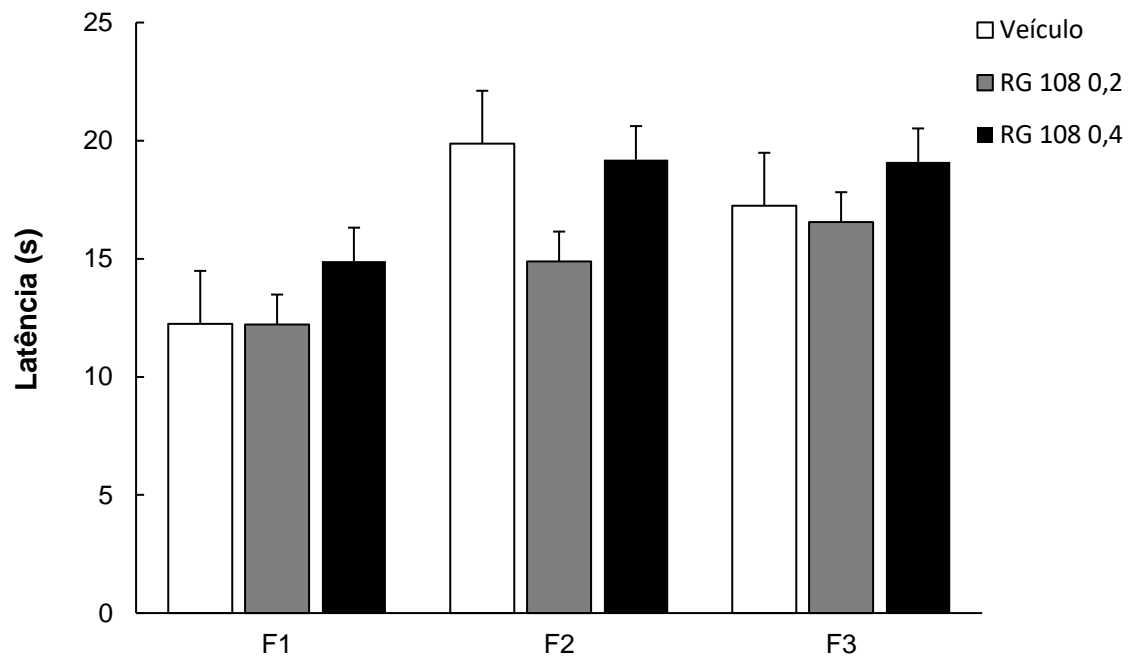
A**B**

Gráfico 5: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/Kg (n=9), 0,4 mg/Kg (n=10) ou veículo (n=8) sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE. O RG 108 e veículo foram administrados 01 hora antes do teste no LTE. Os valores foram expressos pela média \pm EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

Tabela 3: Efeito da administração intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2, 0,4 mg/Kg ou veículo sobre o número de cruzamentos no campo aberto.

Tratamento	Número de Cruzamentos ^a
Veículo	37,88 ± 2,93
RG 108 0,2 mg/kg	35,11 ± 5,31
RG 108 0,4 mg/kg	49,70 ± 6,75

Notas: ^a Dados representam média ± EPM.

4.4 EXPERIMENTO 4: EFEITO AGUDO SISTÊMICO DE RG 108 EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO

Os Gráficos 6, 7 e 8 mostram o efeito do RG 108 administrado por via intraperitoneal nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg comparados com o veículo (grupo controle), nas medidas de latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro, no tempo (%) de permanência no compartimento claro e no número de transições entre os compartimentos, respectivamente, no modelo de transição claro-escuro.

A ANOVA de uma via não mostrou (Gráfico 6) efeito significativo do tratamento na latência para a primeira entrada [$F(2,21) = 1,305$; $p > 0,05$].

Como pode ser observado no Gráfico 7, a ANOVA de uma via mostrou aumento significativo no tempo (%) de permanência no compartimento claro nas doses de 0,2 mg/kg [$F(2,21) = 7,591$; $p < 0,05$] e 0,4 mg/Kg [$F(2,21) = 7,591$; $p < 0,01$] quando comparado com o veículo, sugerindo assim efeito do tipo ansiolítico nas duas doses avaliadas nesse parâmetro.

A ANOVA mostrou também que o tratamento com RG 108 apresentou aumento no número de transições (Gráfico 8) na dose de 0,4 mg/kg [$F(2,21) = 4,668$; $p < 0,05$], sugerindo efeito do tipo ansiolítico apenas na maior dose nesse parâmetro.

A Tabela 4 mostra que a atividade locomotora dos animais no campo aberto não foi alterada pelo tratamento com RG 108 [$F(2,21) = 0,533$; $p > 0,05$].

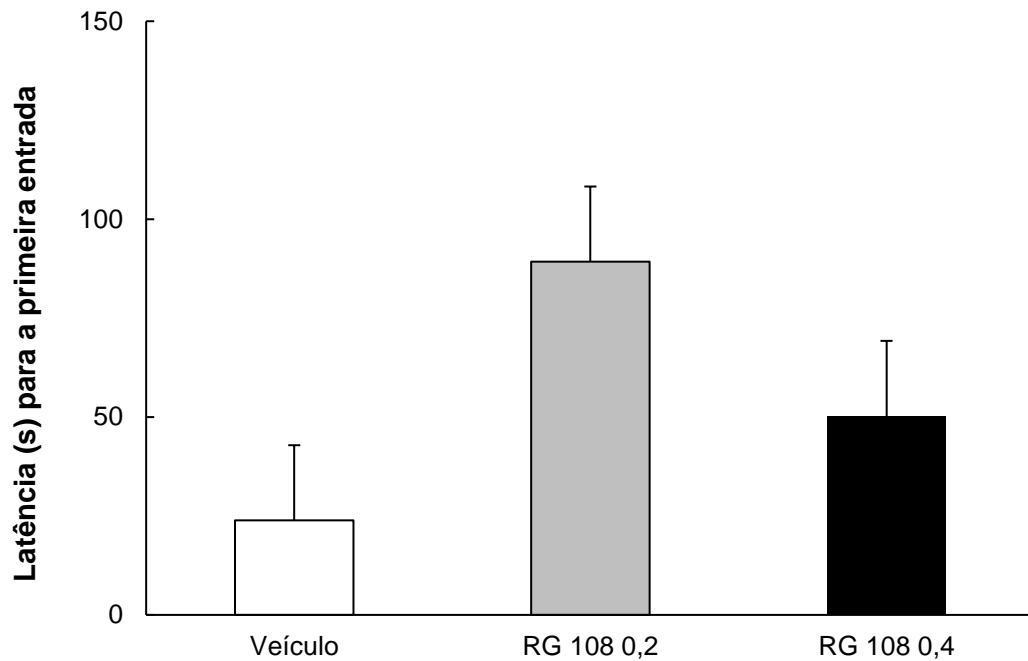


Gráfico 6: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=8), 0,4 mg/kg (n=8) ou veículo (n=8) sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média \pm EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

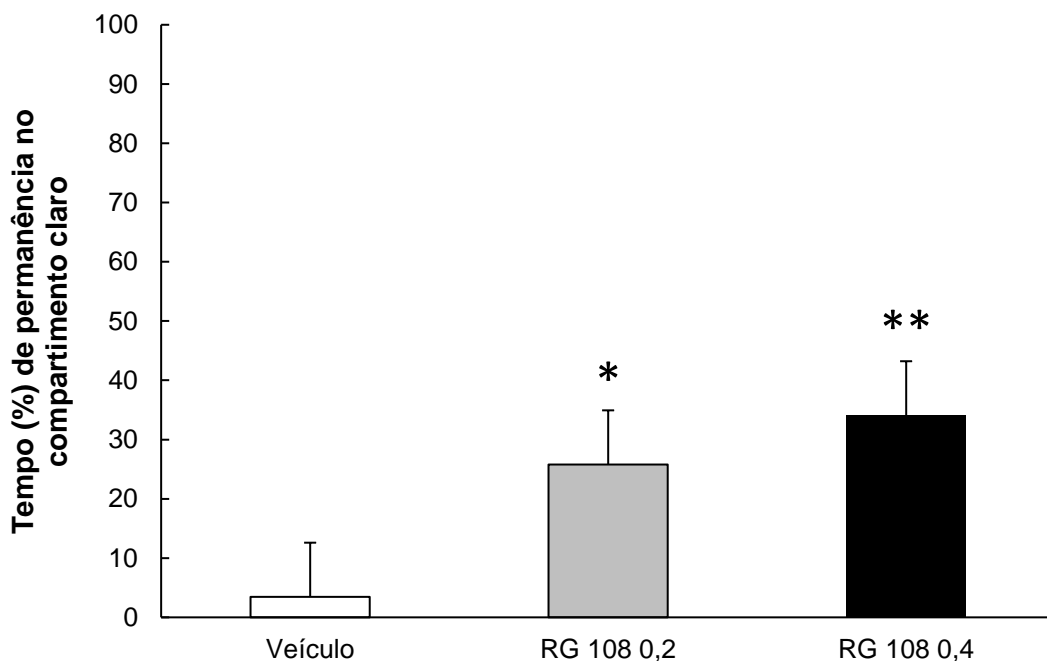


Gráfico 7: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=8), 0,4 mg/kg (n=8) ou veículo (n=8) sobre o tempo de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média \pm EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle.

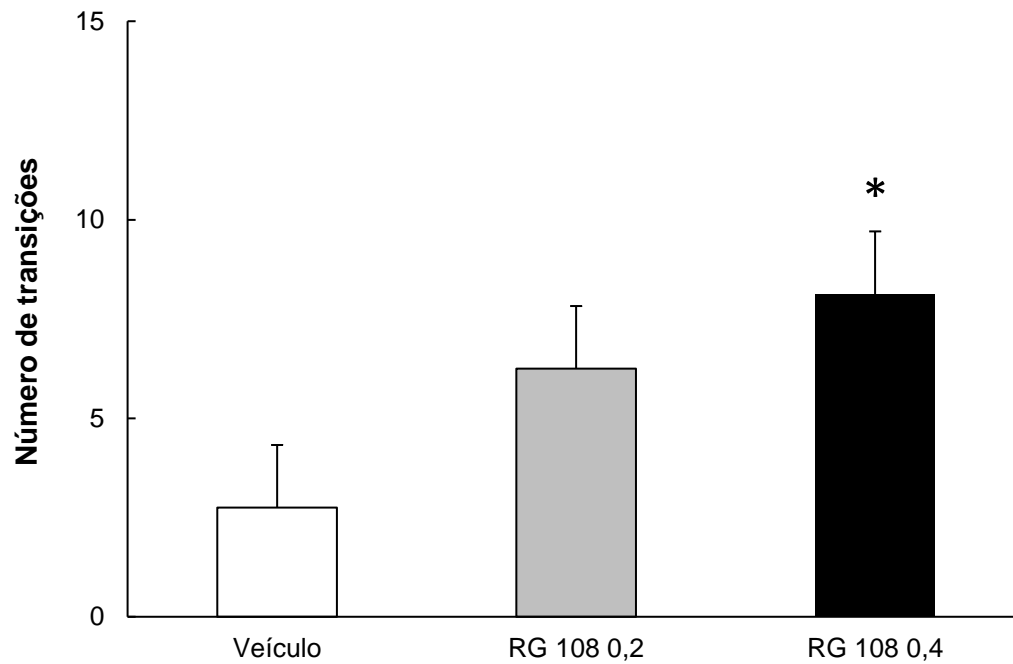


Gráfico 8: Efeito da injeção intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2 mg/kg (n=8), 0,4 mg/kg (n=8) ou veículo (n=8) sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média \pm EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Tabela 4: Efeito da administração intraperitoneal de RG 108 nas doses de 0,2, 0,4 mg/kg ou veículo sobre o número de cruzamentos no campo aberto.

Treatmento	Número de Cruzamentos ^a
Veículo	37,38 \pm 6,19
RG 108 0,2 mg/kg	46 \pm 8,01
RG 108 0,4 mg/kg	38,63 \pm 4,45

Nota : ^a Dados representam média \pm EPM.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigamos a hipótese de que o tratamento agudo sistêmico com inibidores de DNA metiltransferase (5-Aza D ou RG 108) teria um efeito do tipo ansiolítico e/ou panicolítico em animais submetidos ao modelo do labirinto em T elevado e efeito do tipo ansiolítico no modelo de transição claro-escuro.

Cabe ressaltar, que ao nosso conhecimento, não existem estudos publicados na literatura que avaliem uma possível ação de drogas inibidoras da DNA metiltransferase na modulação de comportamentos aversivos relacionados à ansiedade em ratos.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as drogas e doses utilizadas não alteraram a atividade locomotora dos animais medida no teste do campo aberto. Este dado indica que os efeitos observados, tanto no modelo do LTE, quanto no modelo de transição claro-escuro, não sejam devidos à ação inespecífica das drogas utilizadas sobre a atividade locomotora dos animais nesses modelos.

Ademais, diante dos nossos resultados no LTE com as duas drogas testadas, não foi observado efeito significativo em relação à resposta de fuga, sugerindo que os inibidores da enzima DNA metiltransferase não afetam comportamentos relacionados ao transtorno de pânico.

É importante mencionar, que ambos os modelos utilizados em nossos experimentos, por se tratarem de modelos baseados em aversões inatas dos roedores, como altura, espaços abertos e iluminados (GRAEFF et al., 1994; PELLOW et al., 1985; LISTER et al., 1987) oferecem vantagens consideráveis em relação aos demais modelos experimentais de ansiedade existentes, pois não interferem em fatores como alimentação, privação de água, dor por choques elétricos, além de não necessitarem de treinamentos prévios (ONAVI; MARTIN, 1989).

Inicialmente analisamos o efeito do tratamento agudo sistêmico com 5-Aza D no LTE (experimento 1) e os resultados mostram que a menor dose (0,2 mg/Kg) prejudicou a aquisição da esquiava inibitória dos braços abertos, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. Esses resultados estão de acordo com dados recentes de Sales e Joca ainda não publicados mostrando que inibidores de DNA metiltransferase induzem efeito ansiolítico em animais testados em outro modelo de ansiedade, o labirinto em cruz elevado. Além disso, estudos anteriores mostraram que o 5-Aza D foi capaz de

inibir a metilação do DNA no hipocampo de ratos, ativando genes ligados a processos de plasticidade neural, que estavam silenciados pela metilação (LEVENSON et al., 2006; SALES; JOCA, 2015; SALES et al., 2011).

Outro estudo no qual também foi utilizado o modelo do labirinto em cruz elevado para avaliar a ansiedade em ratos *knockout* para a isoforma DNMT1 mostrou efeito do tipo ansiolítico nesse teste, sugerindo que a enzima DNMT1 está claramente envolvida em processos ligados a ansiedade (MORRIS et al., 2016).

Em seguida, no experimento 2, investigamos o efeito do tratamento agudo sistêmico com 5-Aza D em outro modelo de ansiedade já padronizado em nosso laboratório, o teste de transição claro-escuro. Para tal, foi investigada se a administração intraperitoneal de 5-Aza D também apresentaria efeito do tipo ansiolítico no modelo.

Os parâmetros utilizados neste estudo incluem a latência para a primeira entrada no compartimento escuro, o número de transições entre os compartimentos e o tempo de permanência (%) no compartimento claro. Neste sentido, estudos anteriores relatam que o tempo gasto em cada compartimento tem sido referido como um reflexo de aversão (BELZUNG et al., 1987) e o número de transições como um índice de atividade exploratória (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; COSTALL et al., 1989a, 1989b). Já a latência para a primeira entrada no compartimento escuro está envolvida com a inibição do animal (HASCOËT; BOURIN, 1998).

Em relação à latência para a primeira entrada no compartimento escuro, nossos resultados não mostraram efeito significativo dos tratamentos utilizados. Do mesmo modo, dados não publicados do nosso laboratório (SOUZA, 2016) também não encontraram efeitos significantes neste parâmetro da noradrenalina administrada na substância cinzenta periaquedutal dorsal.

Na mesma direção, Grivas e colaboradores (2013) não observaram efeito significativo na latência para a primeira entrada no compartimento escuro ao administrarem sistemicamente o LY379268, um agonista seletivo para um subtipo de receptor de glutamato. No entanto, foi observado efeito do tipo ansiogênico no tempo de permanência no compartimento claro e no número de transições entre os compartimentos.

Por outro lado, Young e Johnson (1991) observaram efeito significativo na latência para a primeira entrada no compartimento escuro ao testarem um agonista de receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) administrado sistemicamente, sem alteração na atividade locomotora.

Embora existam dados na literatura sobre o tempo de latência para a primeira entrada, os autores pouco discutem sobre este parâmetro. No entanto, duas hipóteses são consideradas: o aumento do tempo de latência pode ser resultado de um comportamento desinibido e atenuação da ansiedade, onde os animais passam mais tempo explorando a área iluminada, e a outra seria a influência da sedação, onde os animais não conseguem se mover rapidamente para o compartimento escuro (HASCOËT; BOURIN, 1998).

Ainda em relação ao experimento 1, nossos resultados mostraram aumento significativo no tempo de permanência (%) dos animais no compartimento claro, assim como no número de transições entre os compartimentos claro e escuro dos animais tratados com 5-Aza D nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg se comparado ao grupo controle, sugerindo efeito do tipo ansiolítico.

Assim como nos demais experimentos, não houve alteração na atividade locomotora em nenhuma das doses testadas. Este dado indica que o efeito do tipo ansiolítico do 5-Aza D não está relacionado à ação inespecífica da droga sobre a atividade locomotora dos animais.

Esses resultados no teste de transição claro-escuro reforçam o possível efeito do tipo ansiolítico de 5-Aza D já encontrado no LTE.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar o efeito de outro inibidor de DNA metiltransferase sobre comportamentos relacionados à ansiedade, investigamos se o tratamento com RG 108, um inibidor não nucleosídeo da DNA metiltransferase nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg, apresentaria efeito sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no LTE (Experimento 3) e nos parâmetros avaliados no teste de transição claro-escuro (Experimento 4).

Nossos resultados (Experimento 3) mostram que a administração intraperitoneal de RG 108 nas doses utilizadas no presente estudo não apresentou efeito nas respostas de esquiva inibitória e fuga no labirinto em T elevado. As razões para essa variabilidade nos resultados entre as drogas 5-Aza D e RG 108 testadas no LTE não são claras, porém uma possibilidade seria o fato das duas drogas apresentarem mecanismos de ação distintos: o 5-Aza D precisa ser incorporado ao DNA para inibir a ligação da DNA metiltransferase ao anel de citosina, já o RG 108 é capaz de inibir a DNMT do DNA livre, além de ser específico para a isoforma DNMT1 (ASGATAY et al., 2014), a DNMT mais abundante em células somáticas (ROBERTSON et al., 1999).

No experimento 4, foi observado que não houve efeito significativo do tratamento com RG 108 na latência para a primeira entrada no teste de transição claro-escuro. Porém, houve aumento no tempo de permanência (%) no compartimento claro nas duas doses testadas e aumento significativo no número de transições na dose de 0,4 mg/kg se comparada ao grupo que foi tratado com veículo, sugerindo efeito do tipo ansiolítico. Cabe mencionar, que apesar das inúmeras variações no que se refere à latência para a primeira entrada na literatura, preferimos utilizá-la como parâmetro, pois em adição com os demais parâmetros avaliados é possível aumentar a sensibilidade geral do modelo (KILFOIL et al., 1989).

Ademais, estudos anteriores sugerem que o tempo gasto na área iluminada e o número de transições parecem ser os parâmetros mais genuínos para avaliar a atividade do tipo ansiolítica no modelo de transição claro-escuro (COSTALL et al., 1989; HASCOËT; BOURIN, 1998; KILFOIL et al., 1989; ONAIVI et al., 1989; YOUNG et al., 1990).

Em estudo recente realizado por Sales e Joca (2015) foi analisada a taxa de metilação do DNA no córtex pré-frontal e hipocampo de grupos independentes de ratos trinta minutos após serem submetidos à administração sistêmica de RG 108 na dose de 0,4 mg/Kg e ao nado forçado. Os resultados mostraram que o estresse aumentou os níveis de metilação do DNA nas áreas encefálicas analisadas e que o RG 108 atenuou a metilação. Isso mostra a capacidade do RG 108 de inibir a metilação do DNA no sistema nervoso central de ratos.

Na mesma direção, Murphy e colaboradores em um estudo publicado em 2015, observaram um aumento global da metilação do DNA em pacientes ansiosos e mostraram uma correlação positiva entre a expressão das DNMTs e o nível de ansiedade (MURPHY et al., 2015).

Além disso, as razões para a variabilidade nos resultados entre as drogas nos dois modelos utilizados não são claras, porém uma possibilidade seria as diferenças entre funções motoras, comportamento emocional ou manipulações experimentais sobre os diferentes grupos de animais, como sugerido em um estudo publicado por Staay et al. (2009), enfatizando a necessidade da utilização de múltiplos testes comportamentais para exclusão desses fatores.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostram que a redução da metilação do DNA, por meio de tratamento farmacológico com inibidores da enzima DNA metiltransferase (5-Aza D e RG 108), induziu efeito do tipo ansiolítico em dois

modelos animais de ansiedade. No entanto, são necessários estudos adicionais para delinear o mecanismo de ação do efeito ansiolítico destes inibidores, correlacionando com a possível redução da metilação global de DNA em áreas encefálicas importantes na neurobiologia dos transtornos de ansiedade estudados.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- 5-Aza D na dose de 0,2 mg/kg reduziu a latência da esquiva 1, no labirinto em T elevado, em comparação com o grupo controle, aumentou o tempo (%) de permanência dos animais no compartimento claro e o número de transições no modelo de transição claro-escuro, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.
- 5-Aza D na dose de 0,4 mg/kg mostrou aumento significativo no tempo (%) de permanência dos animais no compartimento claro e no número de transições no modelo de transição claro-escuro, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.
- RG 108 não apresentou efeito significativo nas doses testadas sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga no labirinto em T elevado.
- RG 108 na dose de 0,2 mg/kg aumentou o tempo (%) de permanência dos animais no compartimento claro comparado ao grupo controle, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.
- RG 108 na dose de 0,4 mg/kg aumentou o tempo (%) de permanência dos animais no compartimento claro e o número de transições no modelo de transição claro-escuro, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2010) **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Artmed, Porto Alegre, RS.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-V. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. Porto Alegre : ARTMED, 2014, 5a. Ed
- ASGATAY, S. et al. Synthesis and evaluation of analogues of N-phthaloyl-L-tryptophan (RG108) as inhibitors of DNA methyltransferase 1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 421–34, 23 jan. 2014.
- BATESON, P. William Bateson: a biologist ahead of his time. **Journal of Genetics**, v. 81, n. 2, p. 49–58, 2002.
- BELZUNG, C.; MISSLIN, R.; VOGEL, E. Anxiogenic Effects of in a Light / Dark Choice Situation. **Drugs**, v. 28, p. 29–33, 1987.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, n. 1, p. 43–68, 1988.
- BRANDÃO, Marcus Lira - As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. São Paulo, **Editores Pedagógica e Universitária**, 2004. 223p. ilus. ISBN 85-12-40630-5
- BRUECKNER, B. et al. Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes by a Novel Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Methyltransferases. **Cancer Research**, n. 14, p. 6305–6311, 2005.
- CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Manual de Oncologia de Harrison**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.
- CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 27–35, 1997.
- CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, **Nature Oncogene**, v. 21, n. 35 REV. ISS. 3, p. 5483–5495, 2002.
- COSTALL, B. et al. Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. *Pharmacology*, **Biochemistry and Behavior**, v. 32, n. 3, p. 777–785, 1989a.
- COSTALL, B. et al. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacology*, **Biochemistry and Behavior**, v. 33, n. 1, p. 197–203, 1989b.
- COVIC, M.; KARACA, E.; LIE, D. C. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 122–134, 2010.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. Author's response. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 339–341, 1991.

DOMSCHKE, K. et al. Chromosome 4q31-34 panic disorder risk locus: association of neuropeptide Y Y5 receptor variants. **American Journal of Medical Genetics**. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics, v. 147B, n. 4, p. 510–6, 5, 2008.

ELLIOTT, E. et al. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1351–1353, 2010.

FAHY, J.; JELTSCH, A.; ARIMONDO, P. B. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 12, p. 1427–1442, 2012.

FOULKES, J. M. et al. Epigenetic Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 1, p. 2–17, 2011.

GAO, B.; CUTLER, M. G. Effects of acute and subchronic administration of propranolol on the social behaviour of mice; **An Ethopharmacological Study Neuropharmacology**, 1992.

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

GRAEFF, Frederico Guilherme; GUIMARÃES, Francisco Silveira. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. São Paulo : Atheneu, 2012.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.

HASCOËT, M.; BOURIN, M. A New Approach to the Light / Dark Test Procedure in Mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 3, p. 645–653, 1998.

HASCOËT, M.; BOURIN, M. The mouse light-dark box test. **Neuromethods**, v. 42, p. 197–223, 2002.

HETEM, LUIZ ALBERTO, GRAEFF, FREDERICO G. Transtornos de Ansiedade. São Paulo : **Editora Atheneu**, 2004.

HETTEMA, J. M.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 10, p. 1568–1578, 2001.

HOLLIDAY, R.; PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science (New York, N.Y.)**, v. 187, n. 4173, p. 226–32, 24, 1975.

JABBOUR, E. et al. Evolution of decitabine development: Accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. **Cancer**, v. 112, n. 11, p. 2341–2351, 2008.

JACKSON-GRUSBY, L. et al. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4681–5, 1997.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3S, p. 245–254, 2003.

JONES, P. A. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1068–1070, 2001.

JUTTERMANN, R.; LI, E.; JAENISCH, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 11797–11801, 1994.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 596–612, 2009.

KLAUKE, B. et al. Life events in panic disorder - an update on “candidate stressors”. **Depression and Anxiety**, 27: 716-730, 2010.

KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: A critical review. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 423–437, 2011.

LAPLANT, Q. et al. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 1137–1143, 2010.

LEVENSON, J. M. et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 23, p. 15763–15773, 2006.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 0–5, 1987.

LYKO, F.; STRESEMANN, C. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. **International Journal of Cancer**, v 123, 8-13, 2008.

MARKS, P. A. et al. Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 3, p. 194–202, 2001.

MARX, V. Epigenetics: Reading the second genomic code. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 143–147, 2012.

MCGOWAN, P. O. et al. Promoter-wide hypermethylation of the ribosomal RNA Gene promoter in the suicide brain. **Plos One**, v. 3, n. 5, p. 1–10, 2008.

MERLO PICH, E.; SAMANIN, R. A two-compartment exploratory model to study anxiolytic/anxiogenic effects of drugs in the rat. **Pharmacological Research**, 1989.

MILLER, C. A.; SWEATT, J. D. Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. **Cell Press**, v. 53, n. 6, p. 857–869, 2007.

- MORRIS, M. J.; NA, E. S.; AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L.M. Impact of DNMT1 and DNMT3a forebrain knockout on depressive - and anxiety like behavior in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 135, p. 139-145, 2016.
- MURPHY, T. M. et al. Anxiety is associated with higher levels of global DNA methylation and altered expression of epigenetic and interleukin-6 genes. **Psychiatric Genetics**, v. 25, p. 71-78, 2015.
- MURGATROYD, C. et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 1559–1566, 2009.
- NEMEROFF, C. B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. **Psychopharmacology bulletin**, v. 37, n. 4, p. 133–46, 2003.
- OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 1999.
- OKI, Y.; AOKI, E.; ISSA, J. P. J. Decitabine-Bedside to bench. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 2, p. 140–152, 2007.
- PAWEL SIEDLECKI et al. Discovery of Two Novel, Small-Molecule Inhibitors of DNA Methylation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 678–683, 2005.
- PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.
- PINHEIRO, S. H. et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: Effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 71–85, 2006.
- POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147 (1-2): 185-92, 2003.
- PTAK, C.; PETRONIS, A. Epigenetic approaches to psychiatric disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 25–35, 2010.
- RAZIN, A.; SZYF, M. DNA methylation patterns. Formation and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 782, n. 4, p. 331–42, 1984.
- RIGGS, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 14, n. 1, p. 9–25, 1975.
- ROBERTSON, K. D. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: Coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 11, p. 2291–2298, 1999.
- ROY-BYRNE, P. P. et al. Effect of acute and chronic benzodiazepines on plasma GABA in anxious patients and controls. **Psychopharmacology**, v. 109, n. 1–2, p. 153–6, 1992.

SALES, A. J. et al. Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 6, p. 1711–1721, 2011.

SALES, A. J.; JOCA, S. R. L. Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 28, n. 1, p. 11–22, 2015.

SÁNCHEZ, C. 5-HT(1A) receptors play an important role in modulation of behavior of rats in a two-compartment black and white box. **Behavioural Pharmacology**, 1996.

SAVICKIENE, J. et al. DNA methyltransferase inhibitor RG108 and histone deacetylase inhibitors cooperate to enhance NB4 cell differentiation and E-cadherin re-expression by chromatin remodelling. **Cell Biology International**, v. 36, n. 11, p. 1067–1078, 2012.

SCHIELE, M. A.; DOMSCHKE, K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. **Genes, Brain and Behavior**, p. 1–15, 2017.

SOUZA, D. O. Participação de receptores noradrenérgicos na substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Vitória. Dissertação de mestrado. **UFES**, 2016.

STAAY, F. J. V. D. et al. Emotional and cognitive performance in aversively motivated tasks: a comparison between four rat strains. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, 5-50, 2009.

STUFFREIN-ROBERTS, S.; JOYCE, P. R.; KENNEDY, M. A. Role of epigenetics in mental disorders. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 42, n. 2, p. 97–107, 2008.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, p. 203–222, 1984.

TSANKOVA, N. et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355–367, 2007.

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

WADDINGTON, C. H. Genetic Assimilation of an Acquired Character. **Evolution**, v. 7, n. 2, p. 118–126, 1952.

WADDINGTON, C. H. Genetic Assimilation of the Bithorax Phenotype. **Evolution**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1956.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **Endeavour**, 18-20, 1942.

WEBER, M.; SCHÜBELER, D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 273–280, 2007.

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

YOUNG, R.; JOHNSON, D. N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 40, n. 4, p. 739–43, 1991.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. P3, p. 397–406, 2014.

ZHANG, T.-Y. et al. Maternal Care and DNA Methylation of a Glutamic Acid Decarboxylase 1 Promoter in Rat Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 39, p. 13130–13137, 29, 2010.

ZWANZGER, P.; RUPPRECHT, R. Selective GABAergic treatment for panic? Investigations in experimental panic induction and panic disorder. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 30, n. 3, p. 167–75, 2006.

ANEXO

8 ANEXO

8.1 ANEXO 1 - CÓPIA DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **060/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Participação de fatores epigenéticos na modulação de comportamentos aversivos relacionados à ansiedade e ao pânico em ratos: potencial terapêutico dos inibidores de DNA metiltransferase.**" que tem como responsável o (a) docente **Valquíria Camin de Bortoli**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 12/12/14.

Vitória (ES), 12 de dezembro de 2014.


Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA / UFES