UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Participação do sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado.

VITOR SILVA PEREIRA

Ribeirão Preto

2011

VITOR SILVA PEREIRA

Participação do sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado.

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

Orientadora: Prof. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pereira, Vitor Silva

Participação do sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado. Ribeirão Preto, 2011.

73 fls.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Joca, Sâmia Regiane Lourenço.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Silva Pereira

Participação do sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado.

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

Aprovado em:___/___/2011.

Banca examinadora

Prof(a). Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Instituição: CCB – UFSC

Assinatura:_____.

A minha mãe, Yvanéa.

A minha irmã, Cláudia.

Ao meu avô, Ary.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dr^a. Sâmia Regiane Lourenço Joca, por todo apoio e confiança em mim depositados ao me aceitar como aluno e, principalmente, pela excelente orientação.

Ao professor Dr. Leonardo Resstel, pelo apoio, discussões e conselhos sobre o projeto, sem esquecer os churrascos muito bem preparados por ele e pelo Teo.

A Nádia, esposa do grande colega Teophanes, por ceder sua casa para os churrascos e comemorações sempre com excelentes conversas e muitas risadas.

Ao Vinicius Sato, grande colega e amigo do laboratório, pela ajuda, pelas conversas e discussões sobre pesquisa.

Ao casal Carol e Plínio, pelos conselhos, correções e auxílio no desenvolvimento do projeto e no cotidiano do laboratório.

Aos amigos e amigas do laboratório, Laura, Cassiano, Karina, Michelly, Michele, Ariandra, Deidiane, Murilo, Rafaela e Mateus pela ótima convivência.

À nossa técnica do laboratório Flávia Sallata, pela ajuda no dia a dia do laboratório. Aos técnicos Zé Carlos e Eleni, do laboratório do professor Francisco S. Guimarães, por toda a ajuda.

As secretárias Sonia, Fátima, Marlene e ao José Waldik Ramon por todos os esclarecimentos, ajuda com documentação e também pelos conselhos. A dona Nina por toda a ajuda no laboratório.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela estrutura e condições oferecidas para o desenvolvimento do projeto como um todo.

Ao professor Dr. Francisco Silveira Guimarães, pelas discussões em seminários e pelo espaço cedido em seu laboratório.

Aos fundos de fomento a pesquisa, CNPQ e FAEPA, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e amigas Alejandro, Laena e Janyerson, obrigado pela ótima convivência, amizade e paciência comigo.

Aos amigos e amigas de Santa Catarina com quem cresci ou que fiz durante a faculdade, que mesmo distantes sempre me apoiaram e até hoje continuam presentes. Especialmente ao Lucas Mattos e ao Dilson os quais além de amigos, embora a genética diga que não, são meus irmãos.

A minha família por todo o apoio, torcida, amor e por sempre me darem forças para conquistar meus objetivos.

Finalmente agradeço a minha mãe, Yvanéa Zanelatto Silva, minha base e exemplo de pessoa, que nunca mediu esforços pela minha felicidade e cujo amor, dedicação e ensinamentos foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Mãe, infinitamente obrigado!

Determinação, nunca me deixe
descansar até o meu bom ser ótimo.
E o meu ótimo ser o melhor!

RESUMO

PEREIRA, V.S. **Participação do sistema glutamatérgico do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado. 2011. 73f.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Acredita-se que quantidades elevadas de glutamato estejam relacionadas à neurobiologia da depressão e trabalhos recentes indicam que a quantidade de glutamato cortical está aumentada em pacientes depressivos quando comparada a indivíduos sadios. Dentre as estruturas corticais, o córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv), dividido em infralímbico (IL) e pré-límbico (PL), tem sido mais frequentemente implicado no desenvolvimento de transtornos mentais, como a depressão. Considerando evidências de que o IL e o PL podem agir de forma diferente quanto ao controle emocional em resposta ao estresse, o presente trabalho visou avaliar a hipótese de participação da neurotransmissão glutamatérgica do CPFMv, IL e PL, no desenvolvimento das respostas comportamentais ao estresse de nado forçado, um modelo preditivo de efeitos antidepressivos. Para tal, investigamos os efeitos induzidos pela administração no IL ou no PL, de LY 235959, um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, em três momentos diferentes, em animais submetidos ao teste do nado forçado.

A administração de LY 235959, no IL ou PL, produziu efeitos do tipo antidepressivo, sendo esse efeito sensível ao tempo de administração da droga em relação à exposição ao nado forçado. Sendo assim, foi observado efeito antidepressivo quando o bloqueio glutamatérgico no PL ocorreu imediatamente após o nado ou antes da re-exposição ao estresse; enquanto no IL, o tratamento promoveu efeito antidepressivo apenas quando administrado antes da re-exposição ao nado.

Portanto, os resultados sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores NMDA no CPFMv contribui para o desenvolvimento de consequências comportamentais do estresse, de modo que o bloqueio desses receptores facilitaria a adaptação ao estresse e induziria efeitos do tipo antidepressivo. Os resultados sugerem, ainda, que o PL e o IL participam de maneira semelhante na modulação desses processos.

Palavras chave: Comportamento, Depressão, Glutamato, Córtex pré-frontal medial ventral, Nado forçado.

ABSTRACT

PEREIRA, V.S. Participation of the glutamatergic system of the ventral medial prefrontal cortex in the modulation of behavioral consequences of forced swimming stress. 2011. 73p. Thesis (Masters) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

It is believed that high amounts of glutamate are related to the neurobiology of depression. Recent studies indicate that the amount of cortical glutamate is increased in depressed patients compared to healthy subjects. Among the cortical structures, the ventral medial prefrontal cortex (CPFMv), divided into infralimbic (IL) and prelimbic (PL) has been most often implicated in the development of mental disorders, such as depression. Considering that IL and PL play different roles on the emotional control in response to stress, this study was aimed to evaluate the hypothesis that the activation of glutamate NMDA receptors within the CPFMv, IL and PL, would facilitate the development of forced swimming-induced behavioral responses, an animal model predictive of antidepressants effects. To this end, we investigated the effects induced by the administration in the PL or the IL of LY 235959, an antagonist of NMDA receptors, at three different times, in animals submitted to the forced swimming test.

The administration of LY 235959, in the IL or PL, produced antidepressant-like effects, and this effect is sensitive to moment of drug administration in relation to exposure to forced swimming. Thus, the antidepressant-like effect was observed when blocking the NMDA blockade into the PL occurred immediately after swimming or before re-exposure to stress, whereas in the IL, such treatment promoted antidepressant-like effect only when administered before re-exposure to swimming.

Therefore, the results suggest that the glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the CPFMv contributes to the development of behavioral consequences of stress, so that blocking these receptors would facilitate the adaptation to stress and induce antidepressant-like effects. The results also suggest that PL and IL may be similarly involved in modulating these processes.

Key words: Behavior, Depression, Glutamate, Ventral Medial Prefrontal Pórtex, Forced Swim.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT–	Serotonina / 5-hidroxitriptamina
ACC –	Córtex cingulado anterior
BDNF –	Fator de crescimento derivado do cérebro
CCB-UFSC –	Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina
CNS –	Central nervous system
CoCl₂ –	Cloreto de cobalto
CPFM –	Córtex pré-frontal medial
CPFMv –	Córtex pré-frontal medial ventral
CRFR1 –	Receptor 1 de CRF
EPM –	Erro padrão da média
FCFRP-USP –	Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo
FMRP-USP –	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
IL –	Infra-límbico/infra-limbic
ISRS –	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
ISRSN –	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina
LTP –	Potenciação de longo prazo
LY –	LY235959
mTOR –	Alvo mamífero da rapamicina
NMDA –	N-metil-D-aspartato
NMDAR –	Receptor NMDA
nNOS –	Óxido nítrico sintase neuronal
NO –	Óxido nítrico
PL –	Pré-límbico/pre-limbic
SNC –	Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização das injeções nos animais submetidos a todos os experimentos.....	33
Figura 2. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, antes do pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado	35
Figura 3. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, antes do pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado	36
Figura 4. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, imediatamente após o pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado	38
Figura 5. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, imediatamente após o pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado	39
Figura 6. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado	41
Figura 7. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado	42
Figura 8. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, antes do teste, sobre a atividade locomotora de animais expostos ao campo aberto	44
Figura 9. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, antes do teste, sobre a atividade locomotora de animais expostos ao campo aberto	45

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Depressão.....	13
1.2 Córtex pré-frontal e depressão	17
1.3 Glutamato e depressão	20
1.4 Hipótese.....	25
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Animais	27
3.2 Drogas	27
3.3 Protocolos Experimentais	28
3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas.....	28
3.3.2 Análise Histológica dos sítios de administração de drogas	29
3.3.3 Teste do nado forçado.....	29
3.3.4 Teste do Campo Aberto	30
3.4 Desenho Experimental.....	30
3.5 Análise Estatística.....	31
4. Resultados.....	32
4.1 Localização do sítio de injeção	32
4.2 Efeitos da administração de LY no córtex pré-frontal medial ventral, infra-límbico ou pré-límbico, de ratos submetidos ao teste do nado forçado:	34
4.3 Efeitos da administração de LY no córtex pré-frontal medial ventral, infra-límbico ou pré-límbico, de ratos submetidos ao teste do campo aberto:	43
5. Discussão	46
6. Conclusões.....	59
Bibliografia.....	60

1. Introdução

1.1 Depressão

As descrições sobre transtornos mentais, caracterizadas por desordens do afeto, datam do século 2 d.C., sendo suas observações e descrições médicas realizadas por diferentes populações, como a europeia e a chinesa (Sartorius 2001). Os conceitos e características desses transtornos afetivos, envolvendo elevação e depressão do humor, variaram conforme a época e os estudiosos do assunto, porém com o passar do tempo foram desenvolvidos conceitos mais aprimorados, dividindo-se os sintomas e a gravidade dos distúrbios. No final do século 19 foi produzido, pelo psiquiatra alemão Emil Kraepelin, uma classificação de diagnósticos para as doenças mentais, onde ele separava a depressão e mania de outros distúrbios como a esquizofrenia (Angst & Gamma 2008). Atualmente, as doenças mentais são classificadas segundo manuais de diagnóstico específicos como, por exemplo, o DSM-IV-TR (Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais – Quarta Edição – Texto Revisado) e o CID-10 (10ª revisão da Classificação Internacional de Doenças e problemas de saúde relacionados).

Segundo o DSM-IV-TR, o indivíduo deprimido deve apresentar pelo menos quatro sintomas, por um período de duas semanas consecutivas ou mais, tais como: anedonia, alterações no apetite, no peso e na atividade psicomotora, sentimentos de culpa, dificuldade de pensar ou concentrar-se e pensamentos de morte recorrentes (DSM-IV-TR, 2000).

Os transtornos afetivos, representados principalmente pela depressão maior, estão entre as três maiores causas de debilitação no mundo, sendo associados à

morbidade severa e a um risco aumentado de mortalidade (WHO, 2008). Portanto, essas doenças representam um grave problema de saúde pública para a sociedade moderna.

Apesar de já ser conhecida há séculos, a primeira teoria sobre a neurobiologia da depressão, denominada “teoria monoaminérgica clássica da depressão”, surgiu apenas na década de 60, a partir da observação de que drogas antidepressivas produziam seus efeitos através da facilitação da neurotransmissão monoaminérgica (Schildkraut 1965). Assim, foi proposto que a depressão se desenvolvia devido a uma deficiência na transmissão monoaminérgica no sistema nervoso central (SNC) (Hindmarch 2002; Malberg & Blendy 2005; Schildkraut 1965). Inicialmente, as primeiras classes de antidepressivos utilizadas foram os inibidores da monoamina oxidase (enzima que degrada as monoaminas) e os antidepressivos tricíclicos, drogas que inibem a recaptação de monoaminas (noradrenalina, serotonina - 5-HT – e/ou dopamina), os quais causam diversos efeitos colaterais. Posteriormente, foram desenvolvidas drogas mais seletivas, como os inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS) e os inibidores seletivos da recaptação 5-HT e noradrenalina (ISRSN, antidepressivos mistos), tratamentos com menos efeitos colaterais e que, portanto, melhoraram a adesão dos pacientes ao tratamento (Millan 2006). Na atualidade, em geral, o uso de ISRSN e ISRS são as principais formas de tratamento da depressão, porém o uso dessas medicações não produz resultados terapêuticos completamente satisfatórios.

A hipótese monoaminérgica é, atualmente, considerada reducionista, uma vez que ainda não explica a latência para o início do efeito terapêutico dos antidepressivos e o fato de que cerca de 40% dos indivíduos não responde aos tratamentos farmacológicos disponíveis (Hindmarch 2002; Morilak & Frazer 2004).

Dessa maneira, estudos mais recentes destinados a compreender melhor esse transtorno têm demonstrado que sua neurobiologia é bastante complexa e envolve a participação de outros sistemas de neurotransmissão, tal como o sistema glutamatérgico (Li et al 2006; Skolnick et al 2003).

Teorias baseadas em estudos mais recentes têm discutido e incluído fatores como a pré-disposição genética, a exposição a eventos de estresse e prejuízos na plasticidade estrutural do SNC como eventos fortemente relacionados ao desenvolvimento da depressão (Manji et al 2001; Price & Drevets 2009; Wurtman 2005).

Nesse sentido, muitos trabalhos têm avaliado a relação entre o estresse e a depressão, tendo demonstrado consistentemente que a intensidade do estresse e o modo como o indivíduo responde ao evento estressor podem estar diretamente ligados ao desenvolvimento de episódios depressivos (Amat et al 2005; Calabrese et al 2009; Czeh et al 2008).

A resposta do organismo a eventos estressantes está diretamente relacionada à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e ao controle deste sobre a produção de glicocorticoides (GC), pois este é um dos mecanismos envolvidos na promoção da resposta de adaptação ao estresse (Bale 2006; Calabrese et al 2009; Nestler et al 2002). Entretanto, a exposição a um estresse agudo intenso ou crônico pode causar uma falha ou prejuízo na resposta adaptativa e assim levar a exacerbação da ativação do eixo HPA, com consequente aumento da produção de GC, os quais, em excesso, podem ser neurotóxicos (Bale 2006; Calabrese et al 2009).

Acredita-se que a hipercortisolemia induzida pelo estresse possa promover alterações plásticas e estruturais em diversas regiões do SNC, principalmente em

estruturas límbicas, como o hipocampo e córtex pré-frontal, causando prejuízos funcionais que levariam a respostas comportamentais e emocionais inadequadas, predispondo assim ao desenvolvimento da depressão (Czeh et al 2008; Rocher et al 2004). Dessa forma, diferentes trabalhos já demonstraram que a exposição de animais a modelos de estresse como, por exemplo, o estresse por restrição (Brown et al 2005), estresse social crônico (Rygula et al 2006) e o nado forçado (Izquierdo et al 2006) é capaz de causar inibição da proliferação celular no hipocampo e retração dendrítica no córtex pré-frontal (Brown et al 2005; Czeh et al 2007; Izquierdo et al 2006) e gerar prejuízos comportamentais, como diminuição da atividade exploratória e anedonia (Rygula et al 2006). Tais alterações não acontecem em animais adrenalectomizados expostos ao estresse (Brinks et al 2007; Lopez et al 1998; McEwen & Magarinos 1997), demonstrando que os prejuízos comportamentais e as alterações plásticas decorrentes da exposição ao estresse crônico seriam mediadas pelo aumento de GC.

Tais alterações podem estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas como a depressão, uma vez que grande parte dos pacientes depressivos apresenta um aumento da atividade do eixo HPA, tendo elevação nos níveis séricos de GC e nos níveis de mediadores da ativação do eixo HPA, como o CRF (fator de liberação de corticotropina), e que o tratamento com antidepressivos clássicos é capaz de reverter essas alterações (Bale 2006; de Kloet et al 2005; McEwen 2004; Nestler et al 2002). Corroborando essa ideia, a administração de antagonistas do receptor 1 de CRF (CRFR1) diminuiu a ativação do eixo HPA e induziu efeito tipo-antidepressivo em animais, e, em testes clínicos recentes, o uso do mesmo tipo de droga foi capaz de produzir melhoras nos sintomas depressivos em pacientes com depressão (revisado por Bale 2006).

Considerando que as alterações induzidas por alguns estressores inescapáveis, plásticas ou comportamentais, podem ser atenuadas ou revertidas pelo tratamento repetido com drogas antidepressivas, emprega-se a exposição de animais a tais estressores, como o nado forçado, como modelo experimental para o estudo da neurobiologia da depressão e para a identificação de potenciais novas drogas antidepressivas (Keith Matthews 2005; McArthur & Borsini 2006; O'Neil & Moore 2003).

1.2 Córtex pré-frontal e depressão

O conjunto de estruturas envolvido na modulação da resposta comportamental ao estresse e na neurobiologia da depressão é complexo e compreende muitos locais do SNC. Porém, certas estruturas têm recebido maior destaque, tais como hipocampo, hipotálamo, amígdala, tálamo, giro cingulado e córtex prefrontal, sendo o conjunto dessas estruturas conhecido como sistema límbico (Price & Drevets 2009). Dentre as formações corticais, o córtex pré-frontal medial (CPFM) tem recebido considerável atenção, pois possui conexões proeminentes com a amígdala e outras estruturas límbicas (Price & Drevets 2009). Tal destaque também se deve ao fato de que o CPFM participa de funções de alta-ordem como memória, aprendizado e tomada de decisões, bem como desempenha um papel chave na modulação autonômica e endócrina de resposta ao estresse (Czeh et al 2008). Além disso, alterações funcionais nessa área cortical parecem favorecer o desenvolvimento de transtornos mentais, como ansiedade e depressão (Drevets 2000; Hamani et al 2009; Musazzi et al 2010).

O uso de técnicas com análise funcional de imagens permite observar, por exemplo, que pacientes depressivos apresentam aumento da atividade do CPFM e que o tratamento com antidepressivos reduz a atividade dessa região de forma diretamente relacionada à melhora do quadro clínico de depressão (revisado por Koenigs & Grafman 2009). As alterações do CPFM também parecem estar relacionadas ao curso temporal do desenvolvimento da depressão, onde a quantidade de glutamato cortical é inversamente proporcional ao desenvolvimento e cronicidade da doença (Portella et al 2010).

O CPFM de ratos é citoarquitonicamente dividido em uma porção ventral (CPFMv), que compreende as porções infralímbica (IL) e pré-límbica (PL), e uma porção dorsal que compreende o córtex cingulado anterior (ACC, Vertes, 2004). Enquanto o ACC parece mais relacionado a funções motoras, o CPFMv encontra-se predominantemente envolvido com processos emocionais e cognitivos (Heidbreder & Groenewegen 2003; Vertes 2006). É importante ressaltar que a organização e divisão anatômica do CPFMv de ratos não ocorre da mesma maneira em humanos, sendo o CPFMv considerado funcionalmente homólogo ao córtex pré-frontal orbital medial de humanos (Price & Drevets 2009; Vertes 2006).

Evidências indicam que podem haver diferenças funcionais entre as sub-regiões IL e PL. Na modulação de funções neuroendócrinas em resposta a um estresse emocional, por exemplo, o PL parece ser responsável por inibir a ativação do eixo HPA, enquanto o IL desempenha papel contrário a este (Radley et al 2006). Na modulação de respostas autonômicas a um estresse de restrição, o PL atenua a reposta de taquicardia enquanto o IL facilita tal resposta (Tavares et al 2009). Já no controle da resposta emocional condicionada, a microestimulação do PL promoveu o

aumento do medo contextual e diminuição da extinção desse tipo de memória aversiva, enquanto o IL promoveu efeitos opostos (Vidal-Gonzalez et al 2006).

Por outro lado, há evidências de que o PL e o IL podem modular de maneiras semelhantes determinadas funções comportamentais/emocionais. Nesse sentido, foi demonstrado que a inativação do PL ou IL aumenta respostas de medo inato (Lisboa et al 2010), enquanto respostas de medo aprendido são reduzidas com a inativação dessas regiões corticais (Resstel et al 2006; Resstel et al 2008b).

As diferenças entre as projeções anatômicas do PL e do IL poderiam explicar a divisão funcional entre as duas regiões, pois, dadas algumas exceções, o perfil de distribuição das projeções do IL e PL são diferentes (Vertes 2004; 2006). Por exemplo, o PL possui mais projeções para estruturas límbicas, como o núcleo dorsal da rafe, substância cinzenta periaquedutal e o núcleo basolateral da amígdala; enquanto o IL apresenta mais projeções para centros de controle autonômico e viscero-motor como hipotálamo, núcleo parabraquial e o núcleo central da amígdala (Vertes 2004; 2006). No entanto, algumas estruturas, tais como o córtex orbito-frontal e o núcleo anteromedial do tálamo recebem projeções tanto do IL quanto do PL (Vertes 2004; 2006).

Diferenças funcionais entre IL e PL poderiam embasar a ocorrência de resultados contraditórios a respeito do envolvimento do CPFMV na neurobiologia da depressão, uma vez que trabalhos que não diferenciam o IL do PL encontraram resultados inconsistentes quanto a participação do CPFMV na modulação de respostas comportamentais ligadas a depressão (Hamani et al 2010; Hamani et al 2009; Klein et al 2010).

Com o objetivo de melhor compreender o envolvimento no CPFMV na modulação de tais respostas, nosso grupo de pesquisa investigou a participação

dessa estrutura, diferenciando IL e PL, na modulação das consequências comportamentais induzidas pelo estresse de nado forçado em ratos e demonstrou que tanto a inativação do IL quanto do PL induz efeito tipo antidepressivo (Scopinho et al 2010). Porém, diferenças funcionais entre essas subregiões foram observadas quando a inativação era realizada especificamente após a primeira sessão de nado forçado (Scopinho et al 2010). Assim, esses resultados sugerem que a ativação do CPFMv, tanto PL quanto IL, durante o estresse favorece o desenvolvimento de suas consequências comportamentais, mas que o PL e o IL poderiam contribuir de maneira diferente para esses processos.

Contudo, ainda não são conhecidos os possíveis sistemas de neurotransmissão presentes no PL e no IL que estariam envolvidos na modulação dos processos emocionais descritos anteriormente.

1.3 Glutamato e depressão

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e, após liberado na fenda sináptica, ele pode se ligar a uma série de receptores pré e pós-sinápticos que podem ser ionotrópicos ou metabotrópicos (Kugaya & Sanacora 2005). Os receptores ionotrópicos para glutamato compreendem os receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), do tipo ácido α -amino-3-hidroxy-5-metil-isoxazol-4-propionico (AMPA) e os receptores para kainato (Contractor & Heinemann 2002). Os receptores metabotrópicos para glutamato (mGLUR), por sua vez, se referem a oito subtipos de receptores que se dividem em três grupos conforme sua homologia estrutural e função farmacológica (Coutinho & Knopfel 2002).

A neurotransmissão glutamatérgica tem participação importante na modulação de diferentes funções do SNC, tais como: memória, cognição, neurotoxicidade e plasticidade neural, onde o receptor NMDA (NMDAR) desempenha papel fundamental (Kugaya & Sanacora 2005). O NMDAR é um canal iônico, permeável principalmente ao cálcio, e que pode mediar diferentes ações glutamatérgicas conforme sua localização (Galvan et al 2006; Hardingham et al 2002). Assim, estudos demonstram que, em condições fisiológicas normais, há maior ativação dos NMDAR sinápticos, com manutenção do funcionamento neuronal normal; porém em situações patológicas que causariam aumento excessivo nas quantidades de glutamato ocorreria prevalência da ativação dos receptores NMDA extra-sinápticos e, desse modo, aumento da ativação de mecanismos pró-apoptóticos (Gladding & Raymond 2011; Hardingham & Bading 2010; Leveille et al 2008).

O envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica na neurobiologia da depressão foi inicialmente proposto a partir de observações de que a exposição a um estresse inescapável utilizado como modelo animal de depressão causa alteração na função mediada pelo receptor glutamatérgico do tipo NMDA (Shors et al 1989) e que o tratamento sistêmico com antagonistas desses receptores induz efeitos tipo-antidepressivos no modelo animal do nado forçado (Trullas 1990). Trabalhos posteriores deram maior sustentação a esses resultados ao demonstrar efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de antagonistas de NMDAR em animais submetidos a diferentes modelos de estresse (Skolnick 2002; Skolnick et al 2009). Além disso, dados da literatura mostram que o tratamento crônico com antidepressivos convencionais é capaz de atenuar a expressão dos receptores NMDA em determinadas estruturas do SNC, tais como hipocampo e córtex pré-

frontal (Nowak et al 1993; Pittaluga et al 2007; Skolnick et al 1996). Dessa forma, a dessensibilização do sistema glutamatérgico via receptores NMDA parece ser uma propriedade farmacológica de drogas antidepressivas que estaria relacionada com seu efeito terapêutico. Corroborando essa hipótese, Li e cols. (2006) demonstraram que a administração repetida de antidepressivos a uma cultura de células promoveu significativa atenuação dos efeitos mediados pela ativação de receptores NMDA, compatível com uma situação de dessensibilização desse sistema.

Confirmando os resultados obtidos com animais, estudos clínicos desenvolvidos por Berman et al. (2000) e Zarate et al. (2006) demonstraram que o uso de ketamina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, apresentou um efeito antidepressivo significativo, rápido e sustentado por até duas semanas em pacientes com depressão maior e resistentes a outras formas de tratamento (Berman et al 2000; Zarate et al 2006). Outros trabalhos também demonstram o potencial antidepressivo de diferentes agentes antiglutamatérgicos (Kugaya & Sanacora 2005), merecendo maior destaque os resultados obtidos com o riluzole, um agente antiglutamatérgico que atua inibindo a liberação (Risterucci et al 2006; Wang et al 2004) e aumentando a captação de glutamato (Azbill et al 2000; Frizzo et al 2004). O uso do riluzole, como monoterapia, ou associado a outros antidepressivos monoaminérgicos, vem se mostrando eficaz principalmente em pacientes refratários a outros tratamentos (Sanacora et al 2007; Zarate et al 2004) e em casos de depressão bipolar (Zarate et al 2005). Assim, esses estudos dão sustentação aos resultados obtidos com animais e apontam o sistema glutamatérgico como um novo alvo para a ação de drogas com potencial efeito antidepressivo.

Trabalhos recentes indicam que a neurotransmissão glutamatérgica presente no córtex pré-frontal possa estar envolvida nos efeitos descritos anteriormente, uma vez que a quantidade de glutamato cortical encontra-se consideravelmente aumentada em pacientes depressivos, quando comparada a indivíduos sadios (Sanacora et al 2004). Ademais, através de análise funcional de imagens, foi demonstrado que a atividade do CPFM encontra-se aumentada em indivíduos com depressão (Koenigs & Grafman 2009). Dando sustentação aos achados com humanos, um estudo com animais espontaneamente desamparados observou um aumento da taxa glutamato/GABA, onde a análise de amostras do córtex pré-frontal e do hipocampo mostrou elevação dos níveis de glutamato e queda dos níveis de GABA (Sartorius et al 2007), estando este trabalho na mesma linha de outros que também demonstram um aumento de glutamato no SNC (Kugaya & Sanacora 2005; Levine et al 2000). Semelhantemente, aumento dos níveis de glutamato são descritos em regiões corticais de animais submetidos ao teste do nado forçado (Murakami et al 2009), o que parece se correlacionar positivamente com o desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas por esse modelo animal de depressão (Li et al 2010; Tordera et al 2007).

Portanto, diante do exposto, acredita-se que quantidades elevadas de glutamato em regiões corticais estejam relacionadas ao desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse e à neurobiologia da depressão. De fato, vários trabalhos têm demonstrado que a exposição ao estresse aumenta os níveis de glutamato no córtex pré-frontal (Harvey et al 2004; Moghaddam 1993; Zarate et al 2003) e que indivíduos deprimidos apresentam aumento dos níveis de glutamato em determinadas estruturas corticais (Sanacora et al 2004; Zarate et al 2003). Segundo Zarate et al. (2003), quantidades extracelulares elevadas de

glutamato promoveriam uma ativação persistente de receptores NMDA, levando assim a aumento da concentração intracelular de cálcio, o que contribuiria para o desenvolvimento de mecanismos de neurotoxicidade, principalmente através da ativação de enzimas cálcio dependentes e da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por exemplo o óxido nítrico (NO). Além disso, o aumento da concentração de glutamato extracelular devido ao estresse poderia aumentar a ativação dos NMDAR extra-sinápticos e desencadear os mecanismos pró-apoptóticos mediados por ele (Gladding & Raymond 2011; Hardingham & Bading 2010; Leveille et al 2008), tal como discutido anteriormente. Como consequências ocorreriam os prejuízos estruturais e funcionais, tal como é observado em algumas estruturas límbicas de animais expostos ao estresse e em indivíduos deprimidos (Cameron et al 1998; Campbell & Macqueen 2004; McEwen & Magarinos 1997; Zhou et al 2007). Essa hipótese é reforçada por evidências de que o tratamento com antidepressivos atenua tanto o aumento de glutamato no SNC quanto as alterações plásticas induzidas pelo estresse (Castren 2005; Harvey et al 2005; Murakami et al 2009; Zhou et al 2007). Recentemente um trabalho demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo da ketamina depende de alterações plásticas que ocorrem no CPFMV, através da ativação da mTOR, uma proteína quinase envolvida no controle da síntese proteica (Li et al 2010). Tem sido demonstrado que a mTOR é um alvo comum de diferentes vias envolvidas na promoção de mecanismos plásticos (revisado por Hoeffler & Klann 2010), tais como arborização dendrítica e sobrevivência neuronal, que estão relacionados à melhora de sintomas clínicos de pacientes deprimidos tratados com antidepressivo (Calabrese et al 2009).

Contudo, o preciso envolvimento de receptores NMDA presentes no CPFMV na modulação de comportamentos relacionados à neurobiologia da depressão ainda

não foi investigado. Além disso, não se sabe se haveria diferenças entre a neurotransmissão glutamatérgica presente no IL e no PL na modulação dessas respostas.

1.4 Hipótese

A exposição ao estresse de nado forçado promoveria o desenvolvimento de prejuízos comportamentais que seriam mediados pela neurotransmissão glutamatérgica, via receptores do tipo NMDA, no CPFMV, IL ou PL.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o antagonismo de receptores NMDA presentes no CPFMV, infra-límbico ou pré-límbico, reduz o desenvolvimento das consequências comportamentais induzidos pelo estresse de nado forçado.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a participação dos receptores para glutamato do tipo NMDA, presentes no CPFMV, no IL e no PL, no desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas pela exposição ao estresse de nado forçado em ratos, através da administração local de antagonista seletivo para esses receptores, em diferentes momentos após o estresse.

- Avaliar as possíveis diferenças entre as respostas comportamentais desenvolvidas pela participação do IL e do PL.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 230 a 270 gramas, provenientes do Biotério Central USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos aos pares, em caixas de acrílico (570 cm²), no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em condições controladas: temperatura (24 ± 1 °C), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), sem privação de alimento e água exceto durante a realização do experimento.

3.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- LY235959, LY (Tocris): antagonista seletivo dos receptores para glutamato do tipo NMDA, dissolvido em salina isotônica estéril e administrado através de injeção intracortical, infra-límbica ou pré-límbica, bilateral nas doses de 1,0, 3,0 ou 10,0 nmol (Aguiar et al 2006; Resstel et al 2008a; Tavares et al 2007).

Além disso, foram utilizados durante os procedimentos cirúrgicos: ketamina 10%/xilazina 2% (0,1 mL/100g); Banamine (Schering-Plough, 0,25%, 0,1 mL/100g), Lidocaína (PROBEM 3%, 0,2 ml); e pentabiótico veterinário, (Fort Dodge, 1.200.000 UI), benzilpenicilina benzatina 600.000 UI, benzilpenicilina procaína 300.000 UI, benzilpenicilina potássica 300.000 UI, diidroestreptomicina base (sulfato) 250 mg e estreptomicina base (sulfato) 250 mg), 0,1 ml/100g.

3.3 Protocolos Experimentais

3.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas

Os ratos foram anestesiados com ketamina/xilazina (i.p., concentração de 1:1) na dose de 0,1 ml/100g e fixados na armação estereotáxica. Uma cânula guia (11,0 mm OD) de aço inoxidável foi implantada bilateralmente e direcionada para o córtex pré-frontal medial pré-límbico (coordenadas: Antero-posterior: +3,3 mm, lateral: +1,9 mm, vertical: -2,4 mm do crânio com uma inclinação lateral de 22°) e para o córtex pré-frontal medial infra-límbico (coordenadas: Antero-posterior: +3,3 mm, lateral: +2,7 mm, vertical: -3,2 mm do crânio com uma inclinação lateral de 24°), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). A ponta da cânula estava 1,0 mm acima do local da injeção e a cânula foi presa ao crânio por parafuso de aço e cimento acrílico. Um mandril foi colocado na cânula guia para evitar sua obstrução. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam administração de pentabiótico veterinário (i.m., 0,1 mL/100g) e do antiinflamatório Banamine (0,1 mL/100g), com o objetivo de evitar quadros infecciosos e reduzir a dor pós-operatória. Ao final da cirurgia, os animais eram acondicionados em uma gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 minutos. Após esse período, os animais retornavam às suas gaiolas, onde permaneceram em repouso por 5-7 dias, até o início dos experimentos.

Posteriormente, foram realizados os experimentos comportamentais e as injeções intracerebrais, as quais foram administradas com auxílio de agulhas dentárias (0,3 mm OD) que eram introduzidas bilateralmente através da cânula guia (1,0 mm abaixo do fim da cânula). Foi injetado um volume de 0,2 µL/lado, na velocidade de 1 µL/min, usando uma microseringa controlada por uma bomba de infusão.

3.3.2 Análise Histológica dos sítios de administração de drogas

Ao término dos experimentos comportamentais, os ratos eram anestesiados com ketamina/xilasina e perfundidos com salina isotônica seguida por solução de formalina 10%. Após a perfusão, uma agulha dentária era inserida na cânula guia e 0,2 µl do corante de *azul de evans* foi injetado bilateralmente. Os cérebros foram removidos e imersos em solução de formalina 10%, a fim de serem posteriormente (3-4 dias) seccionados em criostato (Cryocut 1800, -18 °C) numa espessura de 40 µm. Os sítios das injeções foram registrados em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1998), sendo desconsiderados da análise estatística os dados dos animais cujo local da injeção se encontrou fora do córtex pré-frontal medial pré-límbico ou do córtex pré-frontal medial infra-límbico.

3.3.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um modelo animal usado para verificar os efeitos comportamentais induzidos por drogas antidepressivas que, neste caso, são evidenciados através da redução da imobilidade durante o teste (Porsolt et al 1977). O modelo consistiu em colocar os animais para nadar, individualmente, em um cilindro de plástico (30 cm de diâmetro, 40 cm de altura), contendo 25 cm de água com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 15 min (pré-teste) (adaptado de Joca & Guimaraes 2006). Após esse período, os animais foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a sessões de 5 minutos de nado forçado, quando se registrou o tempo total de imobilidade (o animal

permaneceu parado realizando apenas pequenos movimentos necessários para a flutuação), de maneira cega. A água era trocada entre as sessões de nado para evitar a influência de substâncias de alarme (Abel & Bilitzke 1990).

3.3.4 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto é um modelo animal usado para verificar a atividade locomotora e exploratória do animal. O modelo consiste em colocar os animais para se locomoverem livremente, individualmente, no centro de uma caixa quadrada de madeira (72 cm x 72 cm, 40 cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18 cm x 18 cm), por um período de 5 min (adaptado de Strauss et al 2003). Durante esse período, foi contado o número de cruzamentos que o animal fez entre os quadrantes, sendo que cada cruzamento só é contado quando o animal atravessa com as quatro patas de um quadrante para o outro.

3.4 Desenho Experimental

Efeitos da administração de LY no córtex pré-frontal medial, infra-límbico ou pré-límbico, de ratos submetidos ao teste do nado forçado:

- Experimento 1: efeitos da administração de LY antes do pré-teste: os animais receberam injeção bilateral **intra-IL** ou **intra-PL** de LY ou respectivo veículo e, após 10 minutos, foram submetidos ao pré-teste (PT). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, quando então se registrou o tempo total de imobilidade. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

- Experimento 2: grupos independentes de ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém receberam o tratamento farmacológico, no **IL** ou no **PL**, imediatamente após o PT.

- Experimento 3: grupos independentes de ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém receberam o tratamento farmacológico, no **IL** ou no **PL**, 10 minutos antes do teste.

Efeitos da administração de LY no córtex pré-frontal medial ventral, infra-límbico ou pré-límbico, de ratos submetidos ao teste do campo aberto:

- Experimento 4: a fim de analisar possíveis efeitos inespecíficos das drogas sobre a atividade locomotora dos animais, dez minutos antes de serem expostos ao campo aberto, os animais receberam injeção bilateral **intra-PL** ou **intra-IL** de LY ou respectivos veículos, conforme necessário. Após o término do teste, os animais foram perfundidos e seus encéfalos removidos para posterior análise dos sítios de injeção.

Os experimentos foram realizados de forma cega e repetidos pelo menos uma vez, a fim de que se tenha obtido o número final de 6-8 animais/grupo.

3.5 Análise Estatística

Os resultados dos testes utilizando o modelo de nado forçado foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett. A análise dos resultados dos experimentos utilizando modelo do campo aberto foi realizada através de um ANOVA de duas vias com medidas repetidas (tratamento X tempo) seguido do pós-teste de Bonferroni. Em ambas as análises, resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Localização do sítio de injeção

Na figura 1 apresentam-se os diagramas representativos dos locais de injeção no CPFMv, IL e PL dos animais submetidos a todos os experimentos, baseados nas secções coronais adjacentes modificadas do Atlas de Paxinos & Watson, 1998.

Figura 1. Localização das injeções nos animais submetidos a todos os experimentos. Círculos escuros representam as injeções localizadas no CPFMv. Círculos claros representam as injeções fora do CPFMv. 3,70 mm de distância a partir do bregma.

4.2 Efeitos da administração de LY no córtex pré-frontal medial ventral, infra-límbico ou pré-límbico, de ratos submetidos ao teste do nado forçado

- Experimento 1: efeitos da administração de LY antes do pré-teste:

No PL, a administração de LY, nas três doses (1,0, 3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L), não foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma significativa em relação ao grupo controle (Média $\pm$ EPM: veículo: 80,88 $\pm$ 16,16; LY 1 nmol: 86,50 $\pm$ 16,41 LY 3 nmol: 109,2 $\pm$ 13,22; LY 10 nmol: 104,8 $\pm$ 35,14; $F_{(3,20)} = 0,4504$; $p > 0,05$; Dunnett) (Figura 2).

No IL, a administração de LY, nas três doses (1,0, 3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L), também não foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma significativa em relação ao grupo controle (Média $\pm$ EPM: veículo: 127,8 $\pm$ 27,74; LY 1 nmol: 148,1 $\pm$ 16,11 LY 3 nmol: 95,67 $\pm$ 25,88; LY 10 nmol: 116,1 $\pm$ 31,96; $F_{(3,24)} = 0,8062$, $p > 0,05$; Dunnett) (Figura 3).

As administrações realizadas fora do CPFMv foram analisadas juntas e como um grupo independente, sendo denominado como grupo *out*. Cada grupo experimental, referente ao PL e ao IL, tem o seu devido grupo *out*. O resultados do grupo *out*, devido a sua heterogeneidade de dose e local de administração, foram analisados de forma separada com o grupo controle através de um teste T (PL: Média $\pm$ EPM: veículo: 80,88 $\pm$ 16,16; *out*: 97,14 $\pm$ 32,01; $t_{(13)} = 0,4720$, $p > 0,05$; $n=7$; IL: Média $\pm$ EPM: veículo: 95,67 $\pm$ 25,88; *out*: 112,3 $\pm$ 26,99; $t_{(10)} = 0,8478$, $p > 0,05$; $n=11$).

Figura 2. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, antes do pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. $p > 0,05$ (Anova seguido de Dunnett). Salina $n = 8$; LY 1 nmol/0,2 μ L $n = 6$; LY 3 nmol/0,2 μ L $n = 5$; LY 10 nmol/0,2 μ L $n = 5$.

Figura 3. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, antes do pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. $p > 0,05$ (Anova seguido de Dunnett). Salina $n = 6$; LY 1 nmol/0,2 μ L $n = 9$; LY 3 nmol/0,2 μ L $n = 6$; LY 10 nmol/0,2 μ L $n = 7$.

- Experimento 2: efeitos da administração de LY imediatamente após o pré-teste:

No PL, a administração de LY, na dose de 3,0 nmol, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma significativa em relação ao grupo controle. A análise estatística por ANOVA indicou uma tendência nos resultados, $p=0,0777$, sendo que o pós-teste de Dunnett indicou diferença significativa entre as médias do grupo controle e do grupo tratado com a dose de 3,0 nmol, com $p<0,05$. (Média $\pm$ EPM: veículo: $182,9 \pm 24,56$; LY 1 nmol: $124,6 \pm 18,40$; LY 3 nmol: $89,86 \pm 33,90^*$; LY 10 nmol: $119,3 \pm 19,50$; $F_{(3,25)}=2,560$; $p=0,0777$; $*p<0,05$ Dunnett) (Figura 4).

No IL, a administração de LY, nas três doses (1,0, 3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L), não alterou o tempo de imobilidade de forma significativa em relação ao controle (Média $\pm$ EPM: veículo: $126,7 \pm 43,21$; LY 1 nmol: $136,7 \pm 29,79$; LY 3 nmol: $137,8 \pm 20,34$; LY 10 nmol: $131,3 \pm 25,19$; $F_{(3,24)}=0,0296$; $p<0,05$) (Figura 5).

As administrações realizadas fora do CPFMV foram analisadas juntas e como um grupo independente, sendo denominado como grupo *out*. O resultados do grupo *out*, devido a sua heterogeneidade de dose e local de administração, foi analisado de forma separada com o grupo controle através de um teste T (PL: Média $\pm$ EPM: veículo: $182,9 \pm 24,56$; *out*: $131,8 \pm 19,39$; $t_{(21)}=1,592$, $p>0,05$; $n=15$; IL: Média $\pm$ EPM: veículo: $126,7 \pm 43,21$; *out*: $104,5 \pm 20,15$; $t_{(16)}=0,5356$, $p>0,05$; $n=12$).

Figura 4. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, imediatamente após o pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. *representa $p < 0,05$ (Anova seguido de Dunnett). Salina $n = 8$; LY 1 nmol/0,2 μ L $n = 8$; LY 3 nmol/0,2 μ L $n = 7$; LY 10 nmol/0,2 μ L $n = 6$.

Figura 5. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, imediatamente após o pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. $p > 0,05$ (Anova seguido de Dunnett). Salina $n = 6$; LY 1 nmol/0,2 μ L $n = 6$; LY 3 nmol/0,2 μ L $n = 8$; LY 10 nmol/0,2 μ L $n = 8$.

- Experimento 3: efeitos da administração de LY antes do teste:

A administração de LY nas doses de 3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L, no PL, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma significativa em relação ao grupo controle (Média $\pm$ EPM: veículo: 116,3 $\pm$ 21,17; LY 1 nmol: 164,4 $\pm$ 18,92; LY 3 nmol: 28,71 $\pm$ 10,21**; LY 10 nmol: 39,43 $\pm$ 7,99**; $F_{(3,24)} = 13,12$; $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, Dunnett) (Figura 6).

No IL, a administração de LY nas três doses, 1,0; 3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L, reduziu o tempo de imobilidade de forma significativa em relação ao controle (Média $\pm$ EPM: veículo: 154,8 $\pm$ 17,29; LY 1 nmol: 35,25 $\pm$ 6,290***; LY 3 nmol: 89,00 $\pm$ 20,22*; LY 10 nmol: 26,20 $\pm$ 14,29***; $F_{(3,17)} = 14,62$; $p < 0,05$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Dunnett) (Figura 7).

As administrações realizadas fora do CPFMV foram analisadas juntas e como um grupo independente, sendo denominado como grupo *out*. O resultados do grupo *out*, devido a sua heterogeneidade de dose e local de administração, foi analisado de forma separada com o grupo controle através de um teste T (PL: Média $\pm$ EPM: veículo: 116,3 $\pm$ 21,17; *out*: 72,88 $\pm$ 27,07; $t_{(15)} = 1,279$, $p > 0,05$; $n = 8$; IL: Média $\pm$ EPM: veículo: 154,8 $\pm$ 17,29; *out*: 102,2 $\pm$ 15,94; $t_{(23)} = 2,007$, $p > 0,05$; $n = 17$).

Figura 6. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. **representa $p < 0,01$ (Anova seguido de Dunnett). Salina $n = 9$; LY 1 nmol/0,2 μ L $n = 5$; LY 3 nmol/0,2 μ L $n = 7$; LY 10 nmol/0,2 μ L $n = 7$.

Figura 7. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. *representa $p < 0,05$ e ***representa $p < 0,001$ (Anova seguido de Dunnett). Salina $n = 8$; LY 1 nmol/0,2 μ L $n = 4$; LY 3 nmol/0,2 μ L $n = 4$; LY 10 nmol/0,2 μ L $n = 5$.

4.3 Efeitos da administração de LY no córtex pré-frontal medial ventral, infra-límbico ou pré-límbico, de ratos submetidos ao teste do campo aberto

- Experimento 4: efeitos da administração de LY sobre a atividade locomotora:

Neste experimento foram realizados os tratamentos, nas devidas estruturas (PL e IL), apenas com as doses que reduziram o tempo de imobilidade significativamente em relação ao experimento 3, pois no momento de administração do experimento 3 os animais passavam pelo teste ainda sob o efeito da droga (LY 235959).

No PL, a administração de LY, nas duas doses (3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L), não alterou a atividade locomotora dos animais de forma significativa em relação ao grupo controle. Ocorreu um efeito significativo do tempo ($F_{(4,90)} = 8,506$; $p < 0,0001$), mas não houve nenhum efeito do tratamento ($F_{(2,90)} = 0,4703$; $p > 0,05$) ou da interação tratamento e tempo ($F_{(8,90)} = 0,8709$; $p > 0,05$) no número de cruzamentos (Figura 8).

No IL, a administração de LY, nas três doses (1,0, 3,0 e 10,0 nmol/0,2 μ L), também não alterou a atividade locomotora dos animais de forma significativa em relação ao controle. Ocorreu um efeito significativo do tempo ($F_{(4,75)} = 4,159$; $p < 0,01$), mas não houve nenhum efeito do tratamento ($F_{(3,75)} = 0,4730$; $p > 0,05$) ou da interação tratamento e tempo ($F_{(12,75)} = 0,4104$; $p > 0,05$) no número de cruzamentos a cada minuto (Figura 9).

Figura 8. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra PL, antes do teste, sobre a atividade locomotora de animais expostos ao campo aberto. Não foi observado efeito significativo do tratamento (Anova de duas vias com medidas repetidas seguida de Bonferroni). Salina $n=7$; LY 3 $\text{nmol}/0,2 \mu\text{L}$ $n=7$; e LY 10 $\text{nmol}/0,2 \mu\text{L}$ $n=7$

Figura 9. Efeito da administração do antagonista dos receptores NMDA, LY 235959, intra IL, antes do teste, sobre a atividade locomotora de animais expostos ao campo aberto. Não foi observado efeito significativo do tratamento (Anova de duas vias com medidas repetidas seguida de Bonferroni). Salina n= 5; LY 1 nmol/0,2µL n= 6; LY 3 nmol/0,2µL n= 4; e LY 10 nmol/0,2 µL n= 4

5. Discussão

O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica através administração do antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LY 235959) no CPFMV, IL ou PL, foi capaz de produzir efeitos do tipo antidepressivo, sendo esse efeito dependente do momento de administração da droga em relação à exposição ao nado forçado. A sensibilidade das estruturas às doses administradas e ao tempo de administração também se mostrou diferente. Quando administrada a droga no momento antes do teste o IL foi sensível às três doses utilizadas (1,0; 3,0 e 10,0 nmol/0,2 µL), enquanto o PL não respondeu ao tratamento com a menor dose (1,0 nmol/0,2 µL). Já quando realizada administração logo após a exposição ao pré-teste, apenas a dose de 3,0 nmol/0,2 µL injetada no PL foi capaz de produzir efeito do tipo antidepressivo nos animais, enquanto no IL nenhuma das três doses de LY alterou o comportamento dos animais de forma significativa. Na administração de LY antes do pré-teste, nenhuma das três doses, em nenhuma das estruturas, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade de forma significativa.

A exposição de animais ao modelo de nado forçado é um teste muito utilizado na identificação de drogas com potencial efeito antidepressivo (McArthur & Borsini 2006; O'Neil & Moore 2003). O teste consiste em expor o animal a um cilindro preenchido com água, dessa forma promovendo uma situação de estresse inescapável. Após o período inicial onde o animal tenta escapar da situação, há predomínio de um comportamento de imobilidade, o qual é atenuado em animais tratados com antidepressivos (O'Neil & Moore 2003; Porsolt et al 2001; Porsolt et al 1977).

O teste do nado forçado, embora não tenha uma boa validade de face, se tornou um teste muito utilizado devido, principalmente, à sua boa validade preditiva para a detecção de drogas antidepressivas em uso clínico (McArthur & Borsini 2006; Morilak & Frazer 2004; O'Neil & Moore 2003). Nesse teste já ficou bem demonstrado que antidepressivos clássicos, atípicos (McArthur & Borsini 2006) e até antidepressivos mais novos ainda em fase de estudo, como a ketamina (Li et al 2010), promovem redução do tempo de imobilidade dos animais tratados e expostos ao nado forçado. Além disso, o baixo custo e a facilidade de execução, associados ao fato de se tratar de um estresse brando, representam vantagens em relação a outros modelos que utilizam estressores mais intensos, como choques (O'Neil & Moore 2003). Outras vantagens se dão pela possibilidade de se identificar diferentes comportamentos, além da imobilidade, como o *climbing*, o mergulho, *headshakes* e o nado (Lino-de-Oliveira 2005), onde a avaliação destes comportamentos permite a diferenciação entre antidepressivos com ações noradrenérgicas ou serotoninérgicas (Detke et al 1995).

Em modelos como o do nado forçado, o uso de estimulantes psicomotores pode alterar o tempo de imobilidade dos animais e levar a observação de resultados falso-positivos. Portanto, para garantir que os resultados observados no presente trabalho não seriam devidos a alterações motoras, foi avaliado o efeito dos tratamentos utilizados sobre o comportamento dos animais no teste do campo aberto. Dessa forma, nossos resultados demonstraram que as doses que promoveram efeitos significativos no nado forçado não alteraram a atividade locomotora dos animais durante os 5 minutos de exposição ao teste de campo aberto. Assim, esses dados excluem a possibilidade de a redução do tempo de

imobilidade no nado forçado, após a infusão de LY 235959 no IL ou PL antes do teste, ser devido a um aumento inespecífico da atividade locomotora.

Resultados sugerem que o LY 235959, em faixa de dose similar à utilizada neste estudo, não estaria atuando em outros tipos de receptores glutamatérgicos (AMPA e Kainato) (Resstel et al 2008a). Deste modo, podemos sugerir que o tempo de imobilidade reduzido no nado forçado antes do teste, em resposta ao tratamento com LY, reflete um efeito do tipo antidepressivo induzido pelo bloqueio de receptores NMDA, no córtex IL ou PL.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou anteriormente a participação diferencial do IL e do PL na mediação das consequências comportamentais induzidas pelo estresse de nado forçado (Scopinho et al 2010). No referido estudo, foi demonstrado que a inativação do IL ou do PL com cloreto de cobalto (CoCl_2) reduziu o tempo de imobilidade no nado forçado. Porém, enquanto a inativação do PL em quaisquer dos três momentos (antes do pré-teste, logo após o pré-teste e antes do teste) reduziu o tempo de imobilidade significativamente, a inativação do IL somente promoveu tal efeito quando a o bloqueio da estrutura ocorria antes do pré-teste ou antes do teste.

Entretanto, no presente trabalho demonstramos que o bloqueio seletivo de receptores NMDA no CPFMV, ao contrário da inativação completa com CoCl_2 , não induziu efeitos do tipo antidepressivos quando a administração de droga era realizada antes do pré-teste. Com relação às diferenças entre o trabalho de Scopinho et al, 2010, e o presente estudo, é importante considerar que o CoCl_2 é um inibidor reversível de canais de cálcio voltagem-dependentes e que, portanto, bloqueia a liberação de qualquer neurotransmissor no CPFMV (Kretz 1984). Assim, o bloqueio com CoCl_2 é considerado uma forma de bloqueio total da estrutura e seus

efeitos decorrem da inativação de todas as neurotransmissões presentes no local. Já o LY 235959 é antagonista seletivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e, dessa forma, promove um bloqueio seletivo desta neurotransmissão no CPFMV, permitindo o funcionamento de outras formas de neurotransmissão. Portanto, nossos dados acrescentam novas informações quanto à função do IL e do PL na modulação da resposta comportamental ao estresse de nado forçado, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica participe de forma mais proeminente logo após o pré-teste e antes do teste. Assim, considerando os resultados obtidos com a administração de CoCl_2 antes do pré-teste, é possível que, durante o pré-teste, outros neurotransmissores, além do glutamato, tenham uma maior participação na modulação da resposta emocional ao estresse.

Além das diferenças descritas acima, os resultados aqui apresentados mostram uma sensibilidade maior do IL aos tratamentos com LY antes do teste, quando comparado com o PL, visto que ele respondeu a todas as doses utilizadas. Esse fato poderia ser devido a diferenças na expressão de receptores NMDA entre o IL e o PL, o que levaria a essa diferença de sensibilidade ao antagonista NMDA, LY235959, mas não existem dados da literatura que forneçam esse tipo de evidência. Entretanto, são relatadas diferenças na morfologia celular (Czeh et al 2008) e/ou nas projeções anatômicas (Vertes 2004; 2006) das duas estruturas. Além disso, foi demonstrado que o IL e o PL respondem de maneira diferente às alterações morfológicas induzidas pelo estresse (Czeh et al 2008; Perez-Cruz et al 2007), sendo o IL mais susceptível ao desenvolvimento de tais alterações (Izquierdo et al 2006).

A diferenciação de efeitos entre IL e PL, quando administrado o antagonista NMDA após a exposição ao pré-teste, é de grande interesse, pois reforça as

evidências de que as duas estruturas podem trabalhar distintamente em um mesmo tipo resposta. Além disso, dado o fato de que, no momento de administração em questão, se decorrem 24h entre a administração da droga e a re-exposição ao teste, é possível sugerir o envolvimento de mecanismos de plasticidade neuronal nos efeitos observados. Trabalhos mostram que o bloqueio farmacológico da transmissão glutamatérgica com antagonistas NMDA como CPP e Ifenprodil, no CPFMV, logo após a exposição dos animais ao protocolo de extinção de memória aversiva, impede a consolidação da memória adquirida e os animais não apresentam redução da resposta de medo (Burgos-Robles et al 2007; Sotres-Bayon et al 2009). Da mesma forma, a administração de anisomicina, um inibidor de síntese proteica, ou APV, um antagonista NMDA, no CPFMV, após a exposição de animais a objetos desconhecidos, prejudicou a consolidação da memória de reconhecimento e aumentou o tempo gasto pelos animais na investigação do mesmo objeto quando re-expostos ao teste (Akirav & Maroun 2006). Tendo em vista tais dados, nossos resultados parecem indicar que atividade glutamatérgica via NMDA no PL após o pré-teste do nado forçado seria necessária para consolidação da memória aversiva do estresse, parecendo não haver participação do IL nessa mesma situação.

Diversas pesquisas mostram divergências quanto ao tipo de resposta modulada pelo CPFMV-IL ou PL, onde eles podem participar de forma diferente em situações de estresse envolvendo alterações autonômicas (Tavares et al 2009), emocionais (Hamani et al 2009; Vidal-Gonzalez et al 2006) e endócrinas (Radley et al 2006; Weinberg et al 2010). Outros trabalhos já mostram que o CPFMV-IL e PL podem desempenhar o mesmo tipo de função na modulação de comportamentos defensivos (Resstel et al 2006; Resstel et al 2008b). Interessantemente, o trabalho

de Scopinho et al. 2010, demonstrou que dentro de um mesmo tipo de resposta comportamental o IL e o PL podem trabalhar da mesma forma, ou não, em diferentes momentos após a apresentação do estresse. Dessa forma, o presente trabalho segue a mesma linha do trabalho de Scopinho et al. 2010 e mostra pela primeira vez que o bloqueio farmacológico do receptores NMDA do CPFIL e PL, em animais expostos ao nado forçado, pode levar a respostas similares entre as estruturas, onde o efeito observado varia conforme o momento do bloqueio glutamatérgico em relação a exposição ao estresse.

Muitas evidências sustentam o aumento da atividade glutamatérgica no córtex pré-frontal devido à exposição ao estresse (Bagley & Moghaddam 1997; Moghaddam 1993; Skolnick 2002) e em distúrbios do humor, como a depressão (Sanacora et al 2004; Zarate et al 2003). Recentemente, esses dados foram reforçados por estudos como o de Lupinsky et al, 2010, que com o uso de microdiálise mostrou que a simples exposição de animais ao estresse de pinçamento da cauda foi capaz de aumentar a liberação de glutamato no córtex pré-frontal, sendo esse efeito dependente do aumento da comunicação inter-hemisférica (Lupinsky et al 2010). Em outro elegante estudo atual, Mussazi et al, 2010, mostrou, através da aplicação de choques nas patas, um aumento da liberação de glutamato no córtex pré-frontal de ratos. Ainda no mesmo trabalho, o tratamento crônico com antidepressivos como fluoxetina, venlafaxina, desipramina e agomelatina, foi capaz de reduzir a liberação de glutamato induzida pelo estresse de choque nas patas (Musazzi et al 2010). Em conjunto, esses dados sugerem que a liberação glutamato e consequente ativação do córtex pré-frontal em resposta a estressores facilitaria o desenvolvimento das consequências comportamentais do

estresse e que o efeito terapêutico dos antidepressivos poderia estar relacionado à modulação desses efeitos.

Em estudos clínicos, os indícios quanto às alterações da neurotransmissão glutamatérgica no SNC em transtornos depressivos são conflitantes, pois enquanto alguns trabalhos demonstram o aumento da atividade cortical (Koenigs & Grafman 2009) e das quantidades locais de glutamato (Sanacora et al 2004), outros relatam nenhuma alteração nos níveis de glutamato no SNC (Nery et al 2009) ou reduções da expressão de receptores NMDA no córtex pré-frontal de cérebros *post-mortem* de pacientes depressivos (Feyissa et al 2009). Informações interessantes foram descritas por Portella et al, 2010, ao observar que a quantidade de glutamato no córtex pré-frontal medial de pacientes depressivos varia conforme o estágio da doença, estando aumentado nos primeiros episódios e reduzido em pacientes com quadro remitentes ou crônicos da doença (Portella et al 2010). Embora os resultados clínicos quanto às alterações do sistema glutamatérgico no SNC não sejam definitivos, os resultados obtidos com o uso clínico de antagonistas NMDA na melhora de quadros depressivos (Berman et al 2000; Zarate et al 2006) reforçam a base de informações que sustentam a participação desse sistema na neurobiologia da depressão.

A participação de mecanismos cognitivos nos efeitos produzidos pelo bloqueio NMDA no CPFMV (IL e PL) de animais submetidos ao nado forçado não podem ser excluídos, visto que a estrutura participa na formação de memória, estando envolvida nos processos de consolidação, evocação e extinção de memórias aversivas (Akirav & Maroun 2007; Resstel et al 2006; Sierra-Mercado et al 2011). Uma das funções inferidas ao CPFMV é atuar na formação de emoções negativas, estando essas emoções relacionadas a sentimentos de auto-imagem,

tendo assim um papel importante na depressão (Koenigs & Grafman 2009). Referente a esses fatos, pacientes depressivos que sofreram lesões no CPFMV apresentaram melhora quanto a sentimentos de vergonha, culpa, arrependimento e tristeza (sintomas cognitivos/afetivos), diretamente ligados a melhoras no quadro da doença (Koenigs & Grafman 2009). Deste modo, sugere-se que a hiperatividade cortical promova reações negativas exacerbadas, assim impedindo mecanismos de adaptação necessários e aumentando a vulnerabilidade ao desenvolvimento da depressão.

O sistema glutamatérgico via receptores NMDA também está intimamente envolvido em processos de memória e aprendizado. Em excelente revisão de Robins e Murphy, 2006, fica claramente demonstrado que a transmissão via receptores NMDA participa em diversos processos de memória, como, por exemplo, as memórias de trabalho, as de curto e de longo prazo, tanto como nas memórias contextuais aversivas, as espaciais e as de reconhecimento de objetos. Robbins e Murphy também expõem que tais funções cognitivas mediadas pelo receptor NMDA ocorrem em estruturas límbicas, como o córtex pré-frontal, o hipocampo e a amígdala (Robbins & Murphy 2006). Diante do exposto, é possível que o bloqueio glutamatérgico via receptores NMDA no CPFV-IL e PL altere o processamento de memórias aversivas, neste caso, com base em nossos resultados, evitando consolidação e a evocação de tais memórias, e consequentemente diminuindo os prejuízos comportamentais relacionados.

Considerando-se o papel do PL e IL em mecanismos de memória os resultados aqui obtidos com o bloqueio NMDA antes do teste de nado forçado indicam que ambas as estruturas parecem interferir na evocação de memórias aversivas. De fato, dados da literatura demonstram que a atividade do CPFMV é

necessária para evocação de memórias (revisado em Quirk & Beer 2006). O bloqueio do CPFMv, com tetrodotoxina, antes da exposição ao teste de avaliação da extinção de memórias aversivas reduz a expressão do comportamento de *freezing* (Sierra-Mercado et al 2006). A evocação de memória espacial também é prejudicada através do bloqueio do CPFM com lidocaína (Churchwell et al 2010) ou através da inibição de síntese protéica no CPFM (Leon et al 2010). Um estudo em humanos, através da associação entre um modelo de condicionamento ao medo e a técnica de ressonância magnética funcional, demonstrou que a evocação da extinção de memória aversiva está diretamente relacionada com a ativação do CPFMv e do hipocampo, sendo que quanto melhor a memória de evocação da extinção maior foi a ativação dessas duas estruturas (Milad et al 2007). Portanto, nossos resultados sugerem que o bloqueio NMDA do IL ou PL pode impedir a evocação de memórias aversivas e dessa forma promover a melhora de repostas comportamentais, tal como foi visto no presente trabalho.

As principais vias intracelulares ativadas pelo receptor NMDA, e que parecem estar envolvidas na neurobiologia da depressão, são a via do óxido nítrico (NO) e a via da proteína quinase chamada de alvo mamífero da rapamicina (mTOR).

Os receptores NMDA quando ativados promovem um aumento na ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e, conseqüentemente, um aumento na produção de NO (Garthwaite et al 1989). Já foram demonstradas as diversas ações fisiológicas do NO nos mecanismos de memória, em que estudos com animais demonstram que a redução dos níveis basais de NO prejudica a formação de memória (Guix et al 2005; Yamada & Nabeshima 1998); na modulação do humor, com evidências sugerindo que níveis elevados de NO tem efeito pró-depressivo (Harkin et al 1999; Joca et al 2007; Joca & Guimaraes 2006); na plasticidade neural

e no controle dos mecanismos de apoptose (um mecanismo de plasticidade neural) (Akaike et al 1999; Guix et al 2005). Em situações patológicas, ou quando em excesso, o NO pode desencadear efeitos nocivos e, assim, desencadear processos de morte celular (Pryor et al 2006).

A administração crônica de uso de azul de metileno, um inibidor da NOS e da guanilato ciclase solúvel (Volke et al 1999), demonstrou em estudo clínico ter significativo efeito antidepressivo (Naylor et al 1987). Posteriormente, Jefferys e Funder (1996) realizaram experimentos a fim de investigar o possível envolvimento do NO na depressão e então demonstraram que a administração intraperitoneal de inibidor não seletivo das enzimas NOS induz efeito tipo-antidepressivo no modelo do nado forçado (Jefferys & Funder 1996). Estudos mais recentes reforçaram o papel do NO na depressão, onde através de modelos como o nado forçado e o estresse crônico variado, os efeitos antidepressivos produzidos pela inibição do NO foram corroborados (Joca & Guimaraes 2006; Yildiz et al 2000; Zhou et al 2007). Assim, esses estudos sustentam a hipótese da inativação da via NMDA poderia induzir efeitos do tipo antidepressivo por reduzir a formação de NO no SNC.

Quantidades elevadas de glutamato podem diminuir os níveis de neurotrofinas, como o *fator neurotrófico derivado do cérebro* (BDNF), interação essa que prejudica respostas comportamentais. O BDNF é a neurotrofina mais abundante no SNC, e age se ligando principalmente a um receptor do tipo tirosina quinase, o TrkB, e assim promove a ativação de importantes vias de sinalização intracelular, como a via da MAPK e da via PI3K-Akt-mTOR, além de regular a transcrição gênica através da ativação de fatores de transcrição como a proteína CREB (Chen et al 2009; Martin & Finsterwald 2011; Nagahara & Tuszynski 2011). Em processos de plasticidade sináptica o BDNF age prevenindo a degeneração neuronal (Massa et al

2010). Já em alguns processos cognitivos, como memória e aprendizado, o aumento da atividade via BDNF está relacionado à melhora nesses processos cognitivos (Yamada et al 2002). A exposição a eventos estressantes leva a uma redução dos níveis de BDNF que está relacionada à atrofia de estruturas límbicas e menor atividade das mesmas (Stone 2007). Estudos clínicos demonstram que pacientes depressivos apresentam queda nos níveis séricos de BDNF, onde o tratamento com antidepressivos clássicos ou com antagonistas glutamatérgicos são capazes de normalizar os níveis de BDNF, de forma relacionada à melhora do quadro clínico dos pacientes (Nagahara & Tuszynski 2011; Ricci et al 2011). Considerando-se tais evidências, acredita-se que o aumento da liberação de glutamato promovido pelo estresse com consequente aumento das quantidades de NO (Akaike et al 1999) e queda nos níveis de BDNF resulte em mecanismos neurotóxicos exacerbados, assim ocorrendo prejuízos plásticos e funcionais que podem culminar em distúrbios do humor.

Atualmente, a via glutamato/NMDA-mTOR também vem sendo estudada no desenvolvimento de respostas comportamentais induzidas pelo estresse. A mTOR é uma proteína quinase com papel bem estabelecido na síntese de proteínas e devido a esse fato tem sido demonstrado sua importância na plasticidade neuronal e nos processos de memória (Hoeffler & Klann 2010). O tratamento sub-crônico com MK-801 (um antagonista NMDA) mostrou ser capaz de aumentar a síntese de proteínas sinápticas de forma dependente da ativação da mTOR no córtex pré-frontal de ratos (Yoon et al 2008). A formação de memórias de longo prazo, principalmente envolvendo o processo de consolidação, é prejudicada em animais que receberam um bloqueador da mTOR, a rapamicina, em estruturas límbicas como o hipocampo e a amígdala (Bekinschtein et al 2007; Myskiw et al 2008; Parsons et al 2006).

Recentemente, Li et al., 2010 e 2011, mostraram que os efeitos antidepressivos de antagonistas glutamatérgicos, tal como a ketamina (administrada via intra-peritoneal), são dependentes da ativação da via de sinalização da mTOR, no córtex pré-frontal de ratos. Além disso, os efeitos da ketamina no córtex pré-frontal de ratos são relacionados a um aumento da síntese proteica e do número de botões sinápticos (Li et al 2010; Nanxin Li 2011). Interessantemente, a administração repetida por cinco dias de um análogo do BDNF, em camundongos, elevou os níveis dessa neurotrofina e promoveu a ativação da via BDNF/PI3K-Akt-mTOR no hipocampo desses animais. No estudo em questão, a administração diária da mesma substância foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade de animais submetidos ao nado forçado repetido por duas semanas (Furukawa-Hibi et al 2011).

Portanto, é possível sugerir que os resultados obtidos com a administração de LY no PL logo após o pré-teste envolveriam a participação de mecanismos plásticos decorrentes da ativação da via mTOR, como aumento da síntese de proteínas e remodelagem neuronal com aumento no número de botões sinápticos. Possivelmente, o efeito tipo-antidepressivo decorrente do bloqueio dos receptores NMDA no PL dependeria dos seguintes eventos: (1) redução da produção de NO e assim diminuição de mecanismos neurotóxicos induzidos por esse; (2) ativação dos mecanismos mediados pelo BDNF e pela mTOR, resultando no desenvolvimento da plasticidade neural que contribuiria para atenuar efeitos induzidos pelo estresse, como atrofia dendrítica e aumento da morte neuronal.

É importante ressaltar que nosso trabalho diverge das evidências levantadas por Maier e Watkins, 2010, onde eles discutem que inibição do córtex pré-frontal medial prejudica as respostas comportamentais devido à exposição ao estresse de choque inescapável e bloqueia a capacidade do organismo de se adaptar quando

exposto ao estresse de choque escapável (Maier & Watkins 2010). Porém, os diferentes mecanismos neurobiológicos envolvidos na resposta ao choque inescapável e ao nado forçado podem ser os responsáveis por tais discrepâncias. Por exemplo, há evidências de que o núcleo dorsal da rafe esteja hiperativo nos ratos submetidos ao choque inescapável, enquanto nos animais expostos ao nado forçado ele estaria hipoativo (Grahn et al 1999; Roche et al 2003). Outro fator de influência para os resultados discordantes são as formas de se obter o bloqueio do CPFMV. Nos trabalhos revisados por Maier e Watkins, 2010, é utilizado o bloqueio através da administração de muscimol, um agonista dos receptores GABAérgicos do tipo GABA_A, no CPFMV, que age sobre os corpos celulares onde o receptor GABA_A está presente e assim inibe a atividade neuronal dessas vias e não necessariamente de toda estrutura.

Finalmente, podemos sugerir que o bloqueio glutamatérgico no CPFMV-IL e PL antes da re-exposição ao estresse e no CPFMV-PL logo após a primeira exposição ao nado forçado podem prevenir o desenvolvimento de respostas comportamentais em resposta a prévia exposição a situação aversiva, possivelmente devido a facilitação de mecanismos que permitem os animais se adaptarem à situação estressante. Subseqüentemente, o bloqueio do CPFMV IL e PL, antes da primeira exposição, não foi capaz de melhorar resposta comportamental dos animais, podendo ser sugerido que nesse momento outros sistemas de neurotransmissão devem predominar no funcionamento do CPFMV. Estudos adicionais são necessários para caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na participação da neurotransmissão glutamatérgica do CPFMV-IL e PL no desenvolvimento das conseqüências comportamentais em resposta ao estresse.

6. Conclusões

Os resultados do presente trabalho permitem concluir:

- O bloqueio de receptores NMDA no CPFMV, IL ou PL, promove um efeito do tipo antidepressivo no nado forçado, dependendo do momento de administração da droga;
- Receptores NMDA no PL estariam envolvidos na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado logo após esse evento, mas receptores NMDA tanto no PL quanto no IL participariam desses processos nos momentos que antecedem a re-exposição ao estresse;
- Em conjunto, os resultados corroboram o provável envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica presente no CPFMV, e suas sub-regiões IL e PL, via receptores NMDA nele presentes, na neurobiologia da depressão.

Bibliografia

- Abel EL, Bilitzke PJ. 1990. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48:233-9
- Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS. 2006. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav* 83:296-301
- Akaike A, Katsuki H, Kume T, Maeda T. 1999. Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity. *Parkinsonism Relat Disord* 5:203-7
- Akirav I, Maroun M. 2006. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16:1759-65
- Akirav I, Maroun M. 2007. The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast* 2007:30873
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF. 2005. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8:365-71
- Angst J, Gamma A. 2008. Diagnosis and course of affective psychoses: was Kraepelin right? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258 Suppl 2:107-10
- Azbill RD, Mu X, Springer JE. 2000. Riluzole increases high-affinity glutamate uptake in rat spinal cord synaptosomes. *Brain Res* 871:175-80
- Bagley J, Moghaddam B. 1997. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience* 77:65-73
- Bale TL. 2006. Stress sensitivity and the development of affective disorders. *Horm Behav* 50:529-33

- Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk LN, Igaz LM, Cammarota M, et al. 2007. mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 87:303-7
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, et al. 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:351-4
- Brinks V, van der Mark MH, de Kloet ER, Oitzl MS. 2007. Differential MR/GR activation in mice results in emotional states beneficial or impairing for cognition. *Neural Plast* 2007:90163
- Brown SM, Henning S, Wellman CL. 2005. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:1714-22
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ. 2007. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53:871-80
- Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. 2009. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*
- Cameron HA, Tanapat P, Gould E. 1998. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82:349-54
- Campbell S, Macqueen G. 2004. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci* 29:417-26
- Castren E. 2005. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6:241-6
- Chen TJ, Wang DC, Chen SS. 2009. Amyloid-beta interrupts the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway that could be involved in brain-derived neurotrophic factor-induced Arc expression in rat cortical neurons. *J Neurosci Res* 87:2297-307
- Churchwell JC, Morris AM, Musso ND, Kesner RP. 2010. Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 93:415-21

- Contractor A, Heinemann SF. 2002. Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity. *Sci STKE* 2002:re14
- Coutinho V, Knopfel T. 2002. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8:551-61
- Czeh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, et al. 2007. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32:1490-503
- Czeh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flugge G. 2008. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res* 190:1-13
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-75
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I. 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121:66-72
- Drevets WC. 2000. Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* 48:813-29
- Feyissa AM, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B. 2009. Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:70-5
- Frizzo ME, Dall'Onder LP, Dalcin KB, Souza DO. 2004. Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol* 24:123-8
- Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Ikeda T, Morishita K, Liu W, et al. 2011. The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. *Behav Brain Res* 220:271-80
- Galvan A, Kuwajima M, Smith Y. 2006. Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience* 143:351-75

- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413-6
- Gladding CM, Raymond LA. 2011. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Mol Cell Neurosci*
- Grahn RE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, Maier SF. 1999. Opioid-dependent effects of inescapable shock on escape behavior and conditioned fear responding are mediated by the dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res* 99:153-67
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ. 2005. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76:126-52
- Hamani C, Diwan M, Isabella S, Lozano AM, Nobrega JN. 2010. Effects of different stimulation parameters on the antidepressant-like response of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. *J Psychiatr Res* 44:683-7
- Hamani C, Diwan M, Macedo CE, Brandao ML, Shumake J, et al. 2009. Antidepressant-Like Effects of Medial Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation in Rats. *Biol Psychiatry*
- Hardingham GE, Bading H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682-96
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-14
- Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA. 1999. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* 372:207-13
- Harvey BH, Bothma T, Nel A, Wegener G, Stein DJ. 2005. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. *Hum Psychopharmacol* 20:367-73

- Harvey BH, Oosthuizen F, Brand L, Wegener G, Stein DJ. 2004. Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)* 175:494-502
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ. 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27:555-79
- Hindmarch I. 2002. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry* 17 Suppl 3:294-9
- Hoeffler CA, Klann E. 2010. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33:67-75
- Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. 2006. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci* 26:5733-8
- Jefferys D, Funder J. 1996. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol* 295:131-5
- Joca SR, Ferreira FR, Guimaraes FS. 2007. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmitter systems. *Stress* 10:227-49
- Joca SR, Guimaraes FS. 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)* 185:298-305
- Keith Matthews DC, John Swan, Eleanor Sorrell. 2005. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 10
- Klein J, Winter C, Coquery N, Heinz A, Morgenstern R, et al. 2010. Lesion of the medial prefrontal cortex and the subthalamic nucleus selectively affect depression-like behavior in rats. *Behav Brain Res* 213:73-81
- Koenigs M, Grafman J. 2009. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 201:239-43

- Kretz R. 1984. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J Neurosci Methods* 11:129-35
- Kugaya A, Sanacora G. 2005. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr* 10:808-19
- Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC. 2010. Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn Mem* 17:297-305
- Leveille F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, et al. 2008. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22:4258-71
- Levine J, Panchalingam K, Rapoport A, Gershon S, McClure RJ, Pettegrew JW. 2000. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:586-93
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, et al. 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959-64
- Li YF, Zhang YZ, Liu YQ, Wang HL, Cao JB, et al. 2006. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the common actions for antidepressants. *J Psychopharmacol* 20:629-35
- Lisboa SF, Reis DG, da Silva AL, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB. 2010. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:1163-73
- Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. 1998. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 43:547-73
- Lupinsky D, Moquin L, Gratton A. 2010. Interhemispheric regulation of the medial prefrontal cortical glutamate stress response in rats. *J Neurosci* 30:7624-33
- Maier SF, Watkins LR. 2010. Role of the medial prefrontal cortex in coping and resilience. *Brain Res* 1355:52-60

- Malberg JE, Blendy JA. 2005. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 26:631-8
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS. 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541-7
- Martin JL, Finsterwald C. 2011. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 4:14-6
- Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, et al. 2010. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *J Clin Invest* 120:1774-85
- McArthur R, Borsini F. 2006. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84:436-52
- McEwen BS. 2004. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1032:1-7
- McEwen BS, Magarinos AM. 1997. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 821:271-84
- Milad MR, Wright CI, Orr SP, Pitman RK, Quirk GJ, Rauch SL. 2007. Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert. *Biol Psychiatry* 62:446-54
- Millan MJ. 2006. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther* 110:135-370
- Moghaddam B. 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650-7
- Morilak DA, Frazer A. 2004. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 7:193-218

- Murakami T, Yamane H, Tomonaga S, Furuse M. 2009. Forced swimming and imipramine modify plasma and brain amino acid concentrations in mice. *Eur J Pharmacol* 602:73-7
- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, et al. 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One* 5:e8566
- Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2008. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 89:338-51
- Nagahara AH, Tuszynski MH. 2011. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10:209-19
- Nanxin Li R-JL, Jason M. Dwyer, Mounira Banasr, Boyoung Lee, Hyeon Son, Xiao-Yuan Li, George Aghajanian, and Ronald S. Duman. 2011. Glutamate N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists Rapidly Reverse Behavioral and Synaptic Deficits Caused by Chronic Stress Exposure. *BIOL PSYCHIATRY* article in press:8
- Naylor GJ, Smith AH, Connelly P. 1987. A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol Psychiatry* 22:657-9
- Nery FG, Stanley JA, Chen HH, Hatch JP, Nicoletti MA, et al. 2009. Normal metabolite levels in the left dorsolateral prefrontal cortex of unmedicated major depressive disorder patients: a single voxel (1)H spectroscopy study. *Psychiatry Res* 174:177-83
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25
- Nowak G, Trullas R, Layer RT, Skolnick P, Paul IA. 1993. Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1380-6
- O'Neil MF, Moore NA. 2003. Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol* 18:239-54
- Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates - Fourth Edition. Academic Press, Ltd. London, UK. ISBN: 0-12-547617-5

- Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ. 2006. Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J Neurosci* 26:12977-83
- Perez-Cruz C, Muller-Keuker JI, Heilbronner U, Fuchs E, Flugge G. 2007. Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. *Neural Plast* 2007:46276
- Pittaluga A, Raiteri L, Longordo F, Luccini E, Barbiero VS, et al. 2007. Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. *Neuropharmacology* 53:27-36
- Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C, Roux S. 2001. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 10A
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-2
- Portella MJ, de Diego-Adelino J, Gomez-Anson B, Morgan-Ferrando R, Vives Y, et al. 2010. Ventromedial prefrontal spectroscopic abnormalities over the course of depression: A comparison among first episode, remitted recurrent and chronic patients. *J Psychiatr Res*
- Price JL, Drevets WC. 2009. Neurocircuitry of Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*
- Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, et al. 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R491-511
- Quirk GJ, Beer JS. 2006. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 16:723-7
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE. 2006. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 26:12967-76

- Resstel LB, Correa FM, Guimaraes FS. 2008a. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:2027-35
- Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM. 2006. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143:377-85
- Resstel LB, Souza RF, Guimaraes FS. 2008b. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiol Behav* 93:200-5
- Ricci V, Martinotti G, Gelfo F, Tonioni F, Caltagirone C, et al. 2011. Chronic ketamine use increases serum levels of brain-derived neurotrophic factor. *Psychopharmacology (Berl)* 215:143-8
- Risterucci C, Coccorello R, Banasr M, Stutzmann JM, Amalric M, Nieoullon A. 2006. The metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist MPEP and the Na⁺ channel blocker riluzole show different neuroprotective profiles in reversing behavioral deficits induced by excitotoxic prefrontal cortex lesions. *Neuroscience* 137:211-20
- Robbins TW, Murphy ER. 2006. Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends Pharmacol Sci* 27:141-8
- Roche M, Commons KG, Peoples A, Valentino RJ. 2003. Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *J Neurosci* 23:970-7
- Rocher C, Spedding M, Munoz C, Jay TM. 2004. Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex* 14:224-9
- Rygula R, Abumaria N, Domenici E, Hiemke C, Fuchs E. 2006. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. *Behav Brain Res* 174:188-92
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, et al. 2004. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 61:705-13

- Sanacora G, Kendell SF, Levin Y, Simen AA, Fenton LR, et al. 2007. Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. *Biol Psychiatry* 61:822-5
- Sartorius A, Mahlstedt MM, Vollmayr B, Henn FA, Ende G. 2007. Elevated spectroscopic glutamate/gamma-amino butyric acid in rats bred for learned helplessness. *Neuroreport* 18:1469-73
- Sartorius N. 2001. Concepts of depression: sporadic revolutions of continuous evolution. *Hum Psychopharmacol* 16:S3-S6
- Schildkraut JJ. 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-22
- Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR. 2010. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav Brain Res* 214:437-42
- Shors TJ, Seib TB, Levine S, Thompson RF. 1989. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science* 244:224-6
- Sierra-Mercado D, Jr., Corcoran KA, Lebron-Milad K, Quirk GJ. 2006. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci* 24:1751-8
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. 2011. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 36:529-38
- Skolnick P. 2002. Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. *Amino Acids* 23:153-9
- Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R. 1996. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 29:23-6

- Skolnick P, Popik P, Janowsky A, Beer B, Lippa AS. 2003. "Broad spectrum" antidepressants: is more better for the treatment of depression? *Life Sci* 73:3175-9
- Skolnick P, Popik P, Trullas R. 2009. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci* 30:563-9
- Sotres-Bayon F, Diaz-Mataix L, Bush DE, LeDoux JE. 2009. Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cereb Cortex* 19:474-82
- Stone EA. 2007. A final common pathway for depression: implications for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 11:1019-32
- Strauss CV, Maisonneuve SS, Coimbra NC, Zangrossi H, Jr. 2003. Effects of N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesion in rats submitted to the elevated T-maze test of anxiety. *Physiol Behav* 78:157-63
- Tavares RF, Correa FM, Resstel LB. 2009. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87:2601-7
- Tavares RF, Resstel LB, Correa FM. 2007. Interaction between glutamatergic and nitrergic mechanisms mediating cardiovascular responses to L-glutamate injection in the diagonal band of Broca in anesthetized rats. *Life Sci* 81:855-62
- Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, et al. 2007. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur J Neurosci* 25:281-90
- Trullas RaS, Phil. 1990. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal of Pharmacology* 185:10
- Vertes RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58
- Vertes RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1-20

- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. 2006. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13:728-33
- Volke V, Wegener G, Vasar E, Rosenberg R. 1999. Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide synthase activity in vivo. *Brain Res* 826:303-5
- Wang SJ, Wang KY, Wang WC. 2004. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 125:191-201
- Weinberg MS, Johnson DC, Bhatt AP, Spencer RL. 2010. Medial prefrontal cortex activity can disrupt the expression of stress response habituation. *Neuroscience* 168:744-56
- Wurtman RJ. 2005. Genes, stress, and depression. *Metabolism* 54:16-9
- Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. 2002. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci* 70:735-44
- Yamada K, Nabeshima T. 1998. Changes in NMDA receptor/nitric oxide signaling pathway in the brain with aging. *Microsc Res Tech* 43:68-74
- Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. 2000. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 149:41-4
- Yoon SC, Seo MS, Kim SH, Jeon WJ, Ahn YM, et al. 2008. The effect of MK-801 on mTOR/p70S6K and translation-related proteins in rat frontal cortex. *Neurosci Lett* 434:23-8
- Zarate CA, Jr., Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, et al. 2003. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann N Y Acad Sci* 1003:273-91
- Zarate CA, Jr., Payne JL, Quiroz J, Sporn J, Denicoff KK, et al. 2004. An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. *Am J Psychiatry* 161:171-4

- Zarate CA, Jr., Quiroz JA, Singh JB, Denicoff KD, De Jesus G, et al. 2005. An open-label trial of the glutamate-modulating agent riluzole in combination with lithium for the treatment of bipolar depression. *Biol Psychiatry* 57:430-2
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, et al. 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856-64
- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, et al. 2007. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843-54
- WHO, World Health Organization, 2008. The Global Burden of Disease: 2004 update. WHO Press, ISBN 978.92.4.156371.0