UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

DIEGO HENRIQUE DOS SANTOS PEREIRA

*Núcleo Mediano da Rafe e estresse de Nado Forçado: papel dos
receptores de glutamato de tipo NMDA*

RIBEIRÃO PRETO – SP
2010

DIEGO HENRIQUE DOS SANTOS PEREIRA

**Núcleo Mediano da Rafe e estresse de Nado Forçado: papel
dos receptores de glutamato de tipo NMDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
USP, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Ciências,

Área: Psicobiologia.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Maria
Padovan

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Diego Henrique dos Santos

Núcleo Mediano da Rafe e estresse de Nado Forçado: papel dos receptores de glutamato de tipo NMDA. / Diego Henrique dos Santos Pereira. - Ribeirão Preto: USP/FFCLRP, 2010.

61f. : il.. ; 30cm.

Orientador: Cláudia Maria Padovan

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

1. Depressão. 2. Glutamato. 3. Estresse de Nado Forçado. 4. NMDA. 5. Núcleo Mediano da Rafe

Dedico este trabalho à minha família e a minha companheira pelo carinho, paciência, presença e compreensão com o qual me apoiaram durante o tempo de elaboração deste projeto.

Dedico este trabalho a todos os companheiros de laboratório, que muito contribuíram para o meu desenvolvimento, em todos os sentidos.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan (“chefe”) pela paciência, atenção, orientação, oportunidade, mas acima de tudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco, e à Dra. Renata Cristina Habenchus Barros-Fogagnolo, por me darem o incentivo inicial ao mundo da pesquisa e pelo imenso apoio e amizade.

À Renata Vicentini Del Moro pelos auxílios administrativos e também pelas boas risadas compartilhadas.

Aos Professores do Programa, que estiveram sempre à disposição para dar sugestões ou sanar dúvidas.

Aos companheiros pós-graduandos dos outros laboratórios pela amizade e solicitude durante este tempo.

Aos técnicos Dalmo, João e Thalita, que muito ajudaram na execução do projeto.

Aos amigos que fiz dentro do laboratório, Cintia, Gustavo, Selma, Alline, Melissa, Natália, Mayra, Mariana, Diego Padovan, Kelly e Thalita, por me aturarem esse tempo todo.

Ao Paulo Vitor, pela imensa amizade e por todos os momentos cômicos e trágicos que vivenciamos juntos, dentro e fora do laboratório, e principalmente pelo companheirismo e paciência de me ouvir e me animar.

Aos meus pais, Marisa e Vilmar, ao meu irmão Jonathan, a minha avó Maura, pelos ensinamentos, por estarem ao meu lado sempre, pela compreensão e por serem tão incríveis e especiais. Só sou o que sou graças a vocês.

À Fernanda, minha companheira, por estar ao meu lado me amando em todos os momentos, até mesmo nas minhas horas mais sombrias.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Deus por tudo.

RESUMO

Exposição a estressores incontrolláveis leva a mudanças comportamentais e neuroquímicas, que têm sido associadas ao mau funcionamento da via Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) – Hipocampo Dorsal (HD). Estas mudanças comportamentais podem ser atenuadas por injeções intra hipocampais de NMDA ou de agonistas 5-HT_{1a}. Ativação de receptores NMDA (NMDAr) aumentam os níveis de serotonina tanto no NMnR quanto no HD. Neste trabalho, nosso objetivo foi analisar, em animais expostos ao Teste do nado forçado, se a ativação ou bloqueio dos receptores NMDA antes da exposição ao agente estressor ou 24 horas após essa exposição podem prevenir ou atenuar os efeitos do estresse. Ratos Wistar machos receberam duas injeções intra-NMnR de Salina (Sal), NMDA (1nmoles/0,2µL; agonista NMDAr) e/ou AP-7 (3nmoles/0,2µL; antagonista NMDAr) compondo os grupos experimentais: Sal+Sal, Sal+NMDA, AP-7+Sal, AP-7+NMDA. As drogas foram administradas em dois grupos experimentais, antes da pré-exposição ao nado forçado ou 24 horas após a pré-exposição e antes do teste. Foram analisados o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade. A análise dos resultados mostrou que a administração de AP-7 antes da pré-exposição ou antes do teste e a administração de NMDA antes do teste, atenuaram os efeitos comportamentais causados pelo estresse, mostrando o envolvimento desses receptores nos mecanismos de adaptação a eventos aversivo e também que o momento no qual ocorre a intervenção farmacológica influencia essa adaptação.

Palavras-chaves: depressão, nado forçado, NMDA, glutamato, estresse

ABSTRACT

Exposure to uncontrollable stressors leads to behavioral and neurochemical changes, which has been associated to mal functioning of the Median Raphe Nucleus (MnRN)-Dorsal Hippocampus (DH) serotonergic pathway. These deficits can be attenuated by intra-hippocampal injections of NMDA antagonists or 5-HT_{1a} agonists. Activation of MnRN glutamatergic NMDA receptors (NMDAr) increases serotonin release in both MnRN and DH. We previously showed that MnRN injections of NMDA (NMDAr agonist) and/or AP7 (NMDAr antagonist) after pre-test attenuated total time spent immobile in the forced swim test (FST). In this study we used the forced swim test to investigate whether activation and/or blockade of MnRN NMDAr before exposure to swim stress or 24 hours after the exposure, could prevent the effects of this stressor. Rats with cannulas aimed to the MnRN received two intracerebral injections (0.2µl each) of Saline (Sal), AP7 (3nmols) and/or NMDA (1nmol)(5 min interval), administered as follows: Sal+Sal, Sal+NMDA, AP7+Sal and AP7+NMDA. The animals were forced to swim for 15 min and 24 hrs later rats were re-exposed to FST. One group received the treatment before exposure to stress and another group received it 24 hrs later, right before the test. Latency to display immobility and total time spent immobile were registered. After test, all animals were sacrificed under deep anesthesia, perfused and had their brains removed for histological analysis to confirm site of injection. Only animals who had their sites of injection confirmed were used in the analysis (ONEWAY ANOVA/Tukey test). Our data suggest that blockade of glutamatergic neurotransmission in the MnRN before exposure and 24 hrs later, and activation of this transmission 24 hrs later to stress prevents the behavioral consequences of forced swim stress.

Keywords: depression, forced swim, NMDA, glutamate, stress

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral:	27
2.2 Objetivos específicos:	27
3 MATERIAIS.....	28
3.1 Animais.....	29
3.2 Materiais Gerais	29
3.3 Drogas Experimentais.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Procedimento Experimental	34
4.1.1 <i>Cirurgia</i>	34
4.1.2 <i>Teste do nado forçado</i>	36
4.1.3 <i>Análise Comportamental</i>	37
4.1.4 <i>Perfusão</i>	38
4.1.5 <i>Histologia</i>	38
4.2 Grupos Experimentais.....	38
4.2.1 <i>Microinjeções</i>	40
4.3 Análise dos Dados.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Estudo 1 - Injeção prévia ao Pré-Teste.....	44
5.2 Estudo 2 - Injeção prévia ao Teste	49
6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	53
6.1 Discussão.....	54
6.2 Conclusão	60

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO 1	69

1 INTRODUÇÃO

1 Introdução

Todo ser humano apresenta flutuações de afeto e humor em resposta a eventos da sua vida cotidiana. Problemas, alegrias, conquistas, perdas, competições, vitórias, lutos, são todas condições naturais do ciclo cotidiano humano, ocorrendo em momentos diversos e intensidades próprias, e cada condição podendo levar a diferentes respostas e adaptações comportamentais. Em algumas pessoas, no entanto, estas respostas assumem um caráter inadequado em termos de severidade, persistência ou circunstâncias desencadeadoras, caracterizando, assim, a ocorrência de um transtorno de humor (GUIMARÃES, 1997).

Os transtornos de humor podem ser descritos e classificados segundo o Manual Estatístico e Diagnóstico de Distúrbios Mentais (DSM-IV/2000) de acordo com suas características diagnósticas. O DSM é um compêndio publicado pela Associação Americana de Psiquiatria visando criar um padrão de nomenclaturas e critérios para a classificação de distúrbios mentais. Segundo o DSM-IV, os transtornos de humor estão divididos em 3 grupos: os transtornos bipolares, os transtornos depressivos e outros tipos de transtornos de humor.

Os transtornos bipolares são caracterizados por períodos de tempo alternados entre humor deprimido e episódios de mania, sendo este último períodos de humor extremamente elevado, pensamentos rápidos, euforia, agitação e distração, entre outros sintomas. (DSM-IV)

Os outros tipos de transtornos de humor representam alterações de humor com causas específicas, sendo divididos em dois grupos, um deles onde o transtorno é causado fisiologicamente por condições médicas as quais o indivíduo está sujeito, e no outro grupo o transtorno é causado também fisiologicamente, mas devido à ação de alguma droga. (DSM-IV)

Os distúrbios depressivos (que possuem maior prevalência) referem-se a um estado afetivo de tristeza que ocorre em humanos, e sua principal subdivisão é entre depressão maior e distímia (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999).

A distímia é um distúrbio afetivo crônico, com intensidade de sintomas mais baixa do que a depressão maior. A palavra distímia vem do grego, *dysthymia*, no qual *dys* denota “defeituoso, anormal ou irregular”, enquanto *thymia* se refere ao timo, órgão linfático que, na antiguidade, os gregos acreditavam estar associado ao humor, podendo então o termo ser traduzido aproximadamente por “humor defeituoso”. É caracterizada pela presença de humor deprimido durante pelo menos dois anos apresentando dois ou mais dos seguintes sintomas: falta de prazer e satisfação, fadiga, desânimo, baixa auto-estima, variação nos padrões de sono e de apetite, sentimentos de pessimismo e falta de esperança e dificuldades de concentração. Ainda, durante esse período os sintomas devem ser persistentes, não podendo estar ausentes por mais de dois meses consecutivos. (DSM-IV)

A depressão maior é o nome dado a um transtorno de humor caracterizado por humor deprimido, baixa auto-estima e falta interesse ou prazer em atividades normalmente prazerosas. Popularmente chamada apenas de depressão, o termo ‘depressão maior’ foi criado pela Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association) no Manual Estatístico e Diagnóstico de Distúrbios Mentais III de 1980 (DSM-III) e é recomendado para uso médico e científico, já que apenas o termo ‘depressão’ pode designar outros tipos de distúrbios psicológicos.

As principais características da depressão maior são os sentimentos de tristeza ou perda de interesse persistindo por pelo menos duas semanas, e dessa forma interferindo no cotidiano e atividades normais do indivíduo. Para o diagnóstico clínico da depressão maior é necessária a presença de pelo menos cinco dos seguintes sintomas, persistindo por, no mínimo duas semanas (DSM-IV):

- Humor deprimido durante a maior parte do dia
- Perda de interesse ou prazer em toda ou quase todas as atividades durante a maior parte do dia
- Irritabilidade ou agitação
- Perda ou ganho de peso (mudança maior que 5% do peso em um mês) ou diminuição ou aumento do apetite
- Insônia ou sono excessivo
- Diminuição da libido
- Agitação psicomotora ou lentidão dos movimentos

- Fadiga ou perda de energia
- Sentimento de falta de valor, culpa excessiva ou inapropriada
- Redução da capacidade de concentração ou memória
- Sentimentos de falta de esperança
- Pensamentos recorrentes de suicídio ou desejo de morte

Tanto em relação à distímia quanto em relação à depressão maior podem estar presentes sintomas psicóticos e idéias delirantes juntamente aos sintomas descritos acima (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; DSM-IV, 2000).

Quanto à incidência na população, calcula-se que, em um determinado momento, 13 a 20% da população apresentam algum sintoma depressivo e 2 a 3% se encontram hospitalizados ou com as atividades seriamente prejudicadas pela doença, sendo também que os distúrbios depressivos são transtornos crônicos demandando longo período de tratamento e custos financeiros para esse tratamento, e assim, constituindo um importante problema de saúde pública (GUIMARÃES, 1997). Além disso, os sintomas da depressão maior causam um profundo impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo, causando um aumento no número de dias que a pessoa fica incapacitada de atividades (SPITZER et al., 1994; SPITZER et al., 1995) e diminuindo sua produtividade no trabalho (STEWART et al., 2003; SARTORIUS, 2001).

Projeções estatísticas também indicam perspectivas de agravamento no número de casos de depressão maior nos próximos anos e, possivelmente, em 2020 a depressão será a segunda maior causa de invalidez (MURRAY; LOPEZ, 1997). Acredita-se que isso se deva a fatores como o aumento de mudanças demográficas e aumento da expectativa de vida de pessoas com doenças físicas crônicas (SARTORIUS, 2001).

Economicamente a depressão também apresenta um quadro preocupante. Estima-se que em 1993 os Estados Unidos gastaram 44 bilhões de dólares com tratamento para a depressão, envolvendo tratamentos psicológicos, hospitalizações e terapias medicamentosas (DUBOVSKY; DUBOVSKY, 2004) e hoje esse gasto é estimado em mais de 83 bilhões de dólares por ano (GREENBERG et al., 2003),

uma quantia demasiado alta. Deste modo, a busca de meios eficientes de combater a depressão é essencial.

Dados referentes à população americana indicam que aproximadamente 14,8 milhões de americanos adultos (acima de 18 anos) sofreram depressão entre os anos de 2001 e 2003, sendo isso cerca de 6,7 % da população do país em questão. (KESSLER et al., 2005)

Os mecanismos responsáveis pela depressão não estão ainda elucidados. Sabe-se que a etiologia da doença depende de causas genéticas e também de causas não genéticas, embora a tecnologia atual ainda tenha grande dificuldade para encontrar e isolar os fatores genéticos relacionados às desordens psiquiátricas, existem fatores não genéticos que são conhecidos por influenciarem o aparecimento da depressão, como o estresse, infecções virais, trauma emocional e processos aleatórios que podem vir a ocorrer durante o desenvolvimento cerebral (NESTLER et al., 2002).

Existem também evidências de que alterações genéticas causam mudanças em determinados mecanismos nervosos deixando-os suscetíveis a falhas ou mau funcionamento e dessa forma os fatores ambientais, ou não genéticos como foram chamados anteriormente, teriam um maior impacto no desenvolvimento de um episódio de depressão maior (CASPI; SUGDEN; MOFFITT, 2003; HAEFFEL et al., 2008). Esta teoria de que os transtornos psíquicos (incluindo os transtornos de humor e assim a depressão maior) podem ser causados por uma causa biológica (pré-disposição genética) aliada a fatores ambientais (como estresse, experiências pessoais, traumas, vivências próprias) pode ser explicada por uma teoria chamada de Modelo de Diátese-Estresse (Diathesis–Stress Model) (MONROE; SIMONS, 1991), que diz que os efeitos do ambiente são mais efetivos em causar transtornos psíquicos em pessoas com uma vulnerabilidade endógena ou congênita em mecanismos de adaptação ao estresse. Foi primeiramente teorizada na busca de uma explicação para a esquizofrenia e a forma irregular com que esta se manifesta nas pessoas (mesmo as que possuem propensões genéticas), e posteriormente se tornou mais abrangente, englobando outros transtornos psíquicos.

Ainda que a depressão seja uma doença conhecida desde a antiguidade, seus mecanismos biológicos não são completamente conhecidos. Na antiguidade, o

que hoje conhecemos como depressão era então chamada de melancolia, que advém do grego *melano chole*, ou bÍlis negra, definida assim pois os gregos acreditavam que as diferentes doenças eram representadas por diferentes fluÍdos corporais, e um desses fluÍdos, a bÍlis negra, era responsável pelos sintomas da melancolia. Hipócrates, filósofo grego, já definia a melancolia como um tipo de doença sem febre e outros sintomas físicos graves, mas na qual o espírito se mantinha triste e fixado em uma mesma idéia (CUCHE; GERARD, 1994).

Muito do que se sabe sobre os mecanismos biológicos da depressão maior é proveniente das drogas usadas para tratá-la. Aleatoriamente eram descobertos medicamentos que de alguma forma diminuÍam ou amenizavam os sintomas da depressão, e ao serem analisados os mecanismos de ação destes medicamentos, começaram a ser feitas as primeiras inferências relacionadas aos mecanismos da depressão. O primeiro tratamento farmacológico para a depressão ocorreu no início da década de 50 utilizando anfetaminas. Esse tratamento foi uma grande vitória para a psicofarmacologia, pois, graças a ele, a depressão deixou de ser um mal intratável e descobriu-se que haviam formas farmacológicas de tratamento (ainda que apenas amenizasse os sintomas), por outro lado, as anfetaminas apresentavam curta duração dos efeitos antidepressivos e outros problemas, como alto potencial de gerar dependência e grande número de efeitos indesejados (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; GRAEFF, 1990).

Acidentalmente, buscando-se uma droga eficiente para tratamento quimioterápico a tuberculosos, foi descoberta uma nova modalidade de drogas antidepressivas, cujo mecanismo de ação é o de inibir a enzima endógena responsável pela degradação de monoaminas como dopamina (DA), noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) presentes no interior dos terminais nervosos (Inibidores da monoaminaoxidase, IMAO). A ação antidepressiva dessas drogas se daria então pelo acúmulo intraneuronal de aminas. Posteriormente, descobriu-se que além dos IMAO trazerem riscos ao interagir com outras drogas, em doses elevadas causam intoxicação grave e mesmo em doses terapêuticas causam hipotensão arterial e tendem a lesar o parênquima hepático (GRAEFF, 1990).

Ainda nos anos 50, testes realizados com uma substância que supostamente teria efeitos antipsicóticos levaram à descoberta de um novo grupo de

antidepressivos. Estes, denominados antidepressivos tricíclicos, devido a sua estrutura química, atuam bloqueando a recaptação neuronal de 5-HT e NA, porém pouco ou nada a recaptação de DA. Embora menos perigosos que os IMAO, os compostos tricíclicos podem causar efeitos tóxicos e mesmo levar à morte se ingeridos em altas doses (GRAEFF, 1990).

Surgiu, nos últimos 20 anos, um grande número de novos compostos com propriedades antidepressivas. Denominados antidepressivos de segunda geração, são em sua maioria estrutural e farmacologicamente diversos dos antidepressivos tricíclicos tradicionais. Entre eles estão os inibidores seletivos de recaptação neuronal de 5-HT (ISRS), os inibidores seletivos de recaptação de NA (ISRN), bloqueadores dos receptores alfa-2 e 5-HT₂, bloqueadores de recaptação de dopamina ou benzodiazepínicos. Estas drogas possuem menos efeitos colaterais que os antidepressivos tricíclicos, embora em alguns casos apresentem efeitos adversos como, por exemplo, facilitação do aparecimento de crises convulsivas, desenvolvimento de dependência e tolerância. (GUIMARÃES, 1997).

Usando dados obtidos em pesquisas com antidepressivos e seus mecanismos de ação, surgiu a primeira teoria sobre os mecanismos neuroquímicos da depressão, chamada de teoria monoaminérgica da depressão. Primeiramente, em 1967, Schildkraut e Ketty propuseram a teoria noradrenérgica da depressão, segundo a qual a depressão surgiria em decorrência de uma deficiência na transmissão noradrenérgica. Dois anos depois, Lapin e Oxenkrug propuseram a hipótese serotoninérgica da depressão, propondo que este distúrbio seria causado por uma deficiência de 5-HT na fenda sináptica.

No início da década de 70, Europa e EUA buscavam ainda explicar a depressão sob a hipótese catecolaminérgica (baseados na deficiência de noradrenalina na fenda sináptica) e indolaminérgica (baseada na deficiência de serotonina na fenda sináptica), respectivamente. Adicionalmente, a hipótese serotoninérgica teve um reforço muito significativo com o desenvolvimento das drogas Inibidoras Seletivas da Recaptação de Serotonina (ISRS) por cientistas escandinavos. Essas drogas agem impedindo que a serotonina liberada na neurotransmissão seja recaptada pelos neurônios e essa forma fique disponível por

mais tempo na fenda sináptica, compensando uma possível deficiência desse neurotransmissor.

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, novos receptores de 5-HT foram identificados, mostrando, dessa maneira, um caráter muito simplista da teoria monoaminérgica clássica. Ao todo, foram descobertos 14 subtipos de receptores para a serotonina e organizados em 7 famílias de acordo com suas características, sendo as famílias 5-HT_{1A/B/D/E/F}, 5-HT_{2A/B/C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A/B}, 5-HT₆ e 5-HT₇ (BARNES; SHARP, 1999; FILIP; BADER, 2009). O fato de alguns desses receptores serem excitatórios e outros inibitórios, somado à distribuição destes diferentes receptores pelo SNC, mostra um sistema de grande complexidade (BLIER, 2003; KALIA, 2005), reforçando a necessidade de novas teorias que pudessem explicar a etiologia da depressão baseando-se na distribuição diferencial dos receptores serotoninérgicos no SNC.

Com o passar do tempo, se tornou importante o conhecimento da distribuição da serotonina no cérebro e isso levou ao estudo de núcleos cerebrais chamados núcleos da rafe, compostos em sua maioria por neurônios serotoninérgicos e que constituem a principal fonte de neurotransmissão serotoninérgica do SNC. São núcleos neuronais localizados no tronco cerebral, apresentando uma distribuição rostro-caudal e dividindo-se em sistema descendente cujos núcleos são o magno, o pálido e o obscuro, e sistema ascendente, cujos núcleos são o pontino, o dorsal e o mediano. A divisão em ascendente e descendente se deve a posição anatômica de suas projeções neuronais (AZMITIA, 2001; HORNING, 2003; ÖGREN et al., 2008).

No que se refere às teorias propostas para explicar a gênese de transtornos psiquiátricos, Deakin e Graeff (1991) propuseram que o sistema nervoso central possui diferentes mecanismos de controle sobre a depressão e a ansiedade, levando em consideração as diferenças anatômicas e funcionais das diferentes vias serotoninérgicas e os diferentes tipos de receptores envolvidos na funcionalidade dessas vias. Dessa forma, descreveram que sistemas serotoninérgicos distintos regulam respostas adaptativas a estímulos aversivos inatos ou aprendidos de medo/ansiedade. Assim, projeções do núcleo dorsal da rafe (NDR) a receptores do tipo 5-HT_{2A} e 5-HT₃ na amígdala e córtex frontal facilitariam o medo condicionado, propiciando a expressão de respostas defensivas como a esquiva e o congelamento

frente a estímulos ou situações que representam perigos potenciais para o indivíduo. Por outro lado, a via NDR-periventricular, que inerva a matéria cinzenta periaquedutal (MCPD), inibiria reações de fuga e luta em situações de perigo, dor e asfixia. Já as projeções hipocampais originadas no núcleo mediano da rafe (NMnR) teriam um importante papel na resistência ao estresse crônico, pois modulariam respostas desencadeadas por eventos aversivos continuados. O mau funcionamento dos sistemas serotoninérgicos NDR-Amígdala-Córtex e NDR-MCPD poderiam ocasionar, respectivamente, distúrbios patológicos de ansiedade generalizada e de pânico. Já as projeções do NMnR para o hipocampo seriam responsáveis pela mediação da adaptação comportamental a eventos aversivos contínuos, e pelo desenvolvimento de tolerância aos mesmos. O mau funcionamento desse segundo sistema poderia causar desamparo aprendido em animais e depressão no homem.

Segundo esta idéia, a depressão estaria associada a uma falência da capacidade de adaptação dos receptores 5-HT_{1A} na exposição crônica a eventos aversivos, e também ao excesso de neurotransmissão mediada por 5-HT₂. O envolvimento de receptores 5-HT₂ nos distúrbios afetivos ocorreria de forma indireta. Um aumento na neurotransmissão mediada por esse receptor na amígdala e no córtex frontal levaria a uma exacerbação da repercussão emocional de estímulos aversivos, efeito oposto ao desempenhado pela neurotransmissão mediada por 5-HT_{1A}. Recentemente foi descoberto que o fator de liberação de corticotropinas, um peptídeo liberado em situações aversivas e de estresse, causa um aumento no número de receptores 5-HT₂ e também aumento da sensibilização destes receptores, aumentando a resposta a comportamentos de estresse e ansiedade. (MAGALHÃES et al, 2010.) Essa teoria recebeu grande apoio com os experimentos realizados por Kennett e cols. (1985 e 1987). Inicialmente, esses pesquisadores observaram uma diminuição na atividade exploratória de ratos testados em um campo aberto, quando o teste foi realizado vinte e quatro horas após um período de duas horas de imobilização. Esse efeito não foi observado quando os animais foram imobilizados repetidamente, durante sete dias consecutivos, duas horas ao dia. Esses experimentos sugeriram que uma experiência estressante prévia seria capaz de modificar o comportamento do animal quando submetido a uma nova situação e que a exposição repetida a esse estressor levaria ao desenvolvimento de tolerância ao mesmo. Ainda, após uma única imobilização de 2 horas, a administração de 8-

OH-DPAT reverteu os efeitos comportamentais da exposição ao estresse, sendo essa reversão bloqueada pela administração consecutiva de spiperona, antagonista de 5-HT_{1A}, mas não bloqueada pela administração de ketanserina, antagonista 5-HT₂, mostrando a importância do receptor 5-HT_{1A}, na adaptação comportamental ao estresse.

Em outro estudo desse mesmo grupo, Kennett et al. (1985) utilizando injeções sistêmicas de um agonista serotoninérgico, o 5-metoxi-dimetil-triptamina (5-Me-DMT), observaram que o desenvolvimento de tolerância ao estresse vinha acompanhado de uma maior sensibilidade para a manifestação de sinais da chamada “Síndrome Serotoninérgica”. Os sinais observados nesta síndrome incluem abdução dos membros posteriores, tremores (do tipo “*piano playing*”) e achatamento do corpo e parecem ser caracterizados em grande parte por receptores de tipo 5-HT₁. Dessa maneira, os resultados observados sugeriram que a adaptação ao estresse estaria envolvendo um fortalecimento da neurotransmissão mediada por este subtipo de receptor. Essa hipótese foi reforçada pela observação de que os efeitos comportamentais do estresse de imobilização eram revertidos pela administração sistêmica (pós-estresse) do agonista de receptores 5-HT_{1A}, o 8-hidroxi-2(di-n-amino-propilamina)tetralina (ou 8-OH-DPAT). Posteriormente, esses dados foram reforçados pela observação de que tanto a administração intra-hipocampal de 5-Me-DMT (NETTO; GUIMARÃES, 1996) como de zimelidina (um bloqueador de recaptação de serotonina) (PADOVAN; GUIMARÃES, 1993) em animais previamente imobilizados era capaz de atenuar os efeitos desse estressor quando os animais eram submetidos ao teste no labirinto em cruz elevado (LCE). Nesse modelo, animais previamente estressados apresentam uma diminuição da atividade exploratória dos braços abertos do LCE (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). Assim, os autores observaram que o tratamento diminuiu o efeito comportamental de um estressor prévio, mostrando que o hipocampo tem participação no mecanismo de adaptação a estímulos aversivos contínuos.

Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a participação do Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) cujas projeções serotoninérgicas ao Hipocampo Dorsal (HD) são de grande importância, segundo a proposta teórica de Deakin e Graeff (1991). Para esses autores, a via NMnR-HD teria a importante função de desconectar as associações aprendidas, em situações aversivas, como já dito anteriormente.

Utilizando o estresse de imobilização forçada, Andrade e Graeff (2001) e Netto et al (2002) mostraram que a lesão do NMnR promoveu um efeito comportamental ansiolítico quando animais previamente imobilizados foram submetidos ao LCE (quadro de desinibição comportamental). Além disso, esses pesquisadores observaram que quando os animais eram repetidamente expostos à imobilização forçada, os mesmos não se adaptavam a este estressor. Esses resultados reforçam a idéia de que o NMnR e, conseqüentemente a via NMnR-HD, seriam importantes para desconectar as associações aprendidas em situações aversivas.

Contudo, o NMnR também apresenta uma grande quantidade de receptores de glutamato do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato). O glutamato é um aminoácido usado na síntese de proteínas, mas também é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC e possui funções cognitivas importantes como aprendizado e memória (MCENTEE; CROOK, 1993). Possui dois tipos básicos de receptores, os metabotrópicos, que ativam indiretamente canais iônicos na membrana celular através da ativação de uma cascata de reações envolvendo proteína G, e os ionotrópicos que possuem em sua estrutura um canal iônico que é aberto no momento da ativação do receptor. Os receptores ionotrópicos são classificados e nomeados de acordo com o agonista seletivo pra cada um, sendo a nomenclatura deles: receptor AMPA (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate), receptor kainato e receptor NMDA (N-Methyl-D-Aspartate).

Como dito anteriormente, o NMnR possui uma grande quantidade de receptores NMDA de glutamato, que por sua vez interferem na liberação de serotonina dentro dessa mesma estrutura (Tao e Auerbach, 1996). Nesse estudo os pesquisadores mostraram que a ativação dos receptores NMDA (NMDAr) pela administração do próprio agonista (NMDA) no NMnR levava a um aumento na liberação de serotonina tanto no próprio NMnR, assim como no hipocampo. Reforçando esses achados, Wedzony et al. (1997) mostraram que, no Núcleo Dorsal da Rafe, o tratamento com um antagonista glutamatérgico não competitivo de receptores NMDA aumentou a quantidade de receptores 5-HT_{1A} ao mesmo tempo em que aumentou o metabolismo da serotonina, sugerindo assim um aumento da liberação de serotonina nos terminais serotoninérgicos. Mecanismo semelhante também poderia ocorrer no NMnR, no qual os receptores NMDA podem estar envolvidos na liberação de serotonina e, levando em consideração que o NMnR é a

principal fonte de inervação serotoninérgica do hipocampo dorsal (AZMITIA; SEGAL, 1978; VERTES, 1999), isso pode estar relacionado com a adaptação a eventos aversivos.

Vários modelos animais têm sido utilizados na investigação de hipóteses e fármacos relacionados à depressão, assim como a outros transtornos psiquiátricos. Nesse sentido, alguns critérios foram estabelecidos na tentativa de encontrar modelos que sejam os mais fidedignos possíveis, quando utilizados como ferramenta no estudo dos mecanismos subjacentes a transtornos psiquiátricos, por exemplo. Willner (1984, 1985, 1990) sugere que os modelos animais de transtornos psiquiátricos deveriam satisfazer a três critérios de validação. O critério preditivo baseia-se na existência de correlação entre os efeitos da droga na situação clínica e no modelo comportamental. O critério de semelhança ou de analogia verifica se o comportamento do animal no teste assemelha-se com as alterações observadas no distúrbio, e também se o modelo mostra características vistas clinicamente. O critério de construção teórica ou homologia, que pressupõe uma semelhança entre a interpretação teórica do modelo e os conhecimentos da neurobiologia do distúrbio. Alguns exemplos de modelos utilizados para o estudo da depressão são: o teste de suspensão de cauda, o teste do desamparo aprendido, o teste do estresse crônico suave, teste do estresse social e o teste a ser utilizado neste projeto, o teste do nado forçado (NESTLER et al., 2002).

O nado Forçado é um modelo animal experimental utilizado no estudo da depressão. Esse teste foi proposto inicialmente por Porsolt e colaboradores em 1977, e está de acordo com os critérios de validação de modelos animais.

O modelo consiste em colocar o animal, rato ou camundongo, em um recipiente cilíndrico com água, de forma que esse animal não possa se apoiar no fundo do recipiente e também não haja possibilidade de fuga, fazendo assim com que este seja obrigado a nadar pra se manter na superfície, daí advém o nome de "Nado Forçado" (original em inglês é "Forced Swim Test"). Essa situação é o estresse que usaremos no teste, pois proporciona um grande desconforto no animal, por ser desconhecida, incômoda e aversiva, fazendo com que o animal procure uma forma de fugir do recipiente, o que não será possível (por isso chamado de estresse inescapável). Essa impossibilidade de fuga, aliada ao desconforto e aversão

causados pela exposição à água leva ao estado denominado como "desespero comportamental", onde o animal demonstra um comportamento de desistência de nadar, e este estado é analogamente comparado a depressão. Esse comportamento é geralmente observado 24 horas após a primeira exposição, na forma de uma maior latência para imobilidade e tempo total de imobilidade do animal enquanto exposto à água.

Experimentalmente, o modelo é dividido em duas partes, sendo a primeira uma exposição de 15 minutos, e a segunda, 24 horas após a primeira, uma exposição de 5 minutos. A pré-exposição, chamada de Pré-Teste, como dito anteriormente tem duração de 15 minutos e é nesse momento que ocorre a exposição ao estresse inescapável e a possível formação de uma conexão aversiva ou talvez uma memória aversiva, relacionando a situação com o desespero inescapável experimentado pelo animal. A segunda exposição, chamada de Teste, tem duração de 5 minutos e é nesta etapa quando é feita a filmagem do comportamento do animal para posterior análise, avaliando os efeitos da conexão aversiva ou memória aversiva formada anteriormente ante a nova exposição à mesma situação, e também observando se as drogas utilizadas foram capazes de causar desconexão entre o evento aversivo e a re-exposição. (PORSOLT et al., 1977, 1978, 1981). Além disso, o teste do nado forçado satisfaz os critérios de validação de modelos animais (GUIMARÃES et al., 2006; PORSOLT et al., 1977; WILLNER, 1990).

O estresse é um fator ambiental de suma importância no surgimento da depressão. Em cerca de 60% dos casos de episódios de depressão descritos na literatura foi observada ocorrência prévia de fatores estressantes, principalmente psicossociais. (POST, 1992). Segundo WILLNER (1985), a probabilidade do surgimento de um episódio depressivo está aumentada entre 5 e 6 vezes após a ocorrência de eventos estressantes.

O estresse, em termos clínicos, se refere às consequências de uma falha ou mau-funcionamento de um organismo ao responder adequadamente a uma ameaça emocional ou física, real ou imaginária. (SELYE, 1982). Como características primárias, são observados estados de alerta e aumento na produção de adrenalina, irritabilidade, exaustão ou fadiga, tensão muscular contínua, falta de concentração (SELYE, 1982). Além disso, esse estado alterado e o aumento da produção de

adrenalina levam a sintomas físicos como cefaléia e aumento da frequência cardíaca.

Durante o teste do nado forçado, a exposição prévia do animal ao ambiente aquático é uma situação de estresse, um evento aversivo. Uma exposição de 5 minutos ao teste mostrou aumento dos níveis de serotonina no NMnR de ratos durante o teste (ADELL; CASANOVAS; ARTIGAS, 1997) e uma exposição de 15 minutos mostrou diminuição na densidade de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1a} no NMnR de ratos 24 horas após a exposição (BRIONES-ARANDA; ROCHA; PICAZO, 2005). Esses dados sugerem que o estresse causado pelo teste do nado forçado causa alterações na neurotransmissão serotoninérgica nessa estrutura. A serotonina liberada atuaria sobre receptores tipo 5-HT_{1A}, resultando em uma diminuição do disparo neuronal. Assim, esse seria o possível mecanismo responsável pela desconexão das associações aprendidas envolvidas na exposição a situações estressantes.

De acordo com essa suposição, temos dados de nosso próprio laboratório (ALMEIDA; PEREIRA; PADOVAN, *in prep.*) no qual foi observado que, logo após a pré-exposição ao nado forçado, a administração de 8-OH-DPAT (agonista seletivo de receptores 5-HT_{1a}) intra-NMnR diminuiu os efeitos do estresse no comportamento dos animais, e, também, que a administração prévia intra-NMnR de WAY100635 (antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1a}) bloqueou os efeitos do 8-OH-DPAT nos animais.

Outros dados de nosso laboratório (PEREIRA; ALMEIDA; PADOVAN *in prep.*) mostraram que a administração de NMDA (agonista glutamatérgico) no NMnR foi capaz de atenuar os efeitos induzidos pelo estresse de nado forçado, quando administrado imediatamente após a exposição ao nado (pré-exposição). Entretanto, nessas mesmas condições experimentais o AP-7 (ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico), um antagonista de NMDAr, também promoveu atenuação desses efeitos do estressor numa exposição subsequente.

Considerando-se o exposto acima, poderíamos supor que a ativação de NMDAr e o conseqüente aumento na liberação de serotonina nessa estrutura e no hipocampo (TAO; AUERBACH 1996) durante episódios estressantes estariam

colaborando para dificultar a consolidação das memórias aversivas relacionadas a esses eventos.

No que se refere aos processos subjacentes à memória, existem também evidências na literatura que sugerem a existência de uma circuitaria temporal, essencial para os processos de aquisição, consolidação e evocação de memórias (IZQUIERDO et al., 2006; IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Em resumo, os trabalhos sugerem que, dependendo do momento em que, por exemplo, uma intervenção farmacológica ocorre, e também da estrutura cerebral onde essa intervenção é realizada, esses processos relacionados à memória serão alterados (PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; ZANATTA et al., 1997, IZQUIERDO et al., 2006; IZQUIERDO; MEDINA, 1997).

Considerando-se o exposto anteriormente, Padovan e Guimarães (2000, 2003), mostraram que o momento em que ocorre a interferência sobre a neurotransmissão glutamatérgica mediada por NMDA no hipocampo, é determinante nas conseqüências desencadeadas pelo agente estressor e também parece depender do agente estressor utilizado. Por exemplo, a atenuação dos efeitos comportamentais do estresse de restrição forçada, só ocorreu quando o bloqueio de receptores NMDA no hipocampo foi realizado imediatamente após a exposição a este estressor, ou vinte e quatro horas antes (imediatamente antes do teste no LCE) (PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Diferentemente do observado com o estresse de restrição, as conseqüências comportamentais da pré-exposição ao nado forçado só foram atenuadas com a administração intra-hipocampal de AP-7 imediatamente após o episódio estressante (PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). Ainda, a atenuação dos efeitos da exposição a choques elétricos inescapáveis, somente foi observada quando o AP-7 foi administrado no hipocampo antes da pré-exposição, ou imediatamente antes do teste em animais estressados.

Embora a explicação para as diferenças observadas não sejam claras, é possível que não só a natureza do estímulo estressor, como também suas duração e intensidade levem a alterações expressivas no funcionamento da formação hipocampal e na circuitaria a ela associada, e que resultam nas diferenças comportamentais observadas.

Além disso, conforme já citado, existem dados anteriores de nosso grupo que mostraram que tanto o AP-7 quanto o NMDA foram capazes de atenuar os efeitos da pré-exposição ao nado forçado, sugerindo a existência de um mecanismo de controle tônico sobre o funcionamento do NMnR mediado por neurônios glutamatérgicos (TAO; AUERBACH, 2003).

Esse mecanismo atuaria sobre o funcionamento do NMnR e, portanto, da via NMnR-Hipocampo, assim como sobre a liberação de serotonina no próprio NMnR e também no Hipocampo, mecanismos esses que seriam responsáveis pela adaptação a estímulos aversivos/estressantes repetidos (TAO; AUERBACH, 2003; GARTSIDE et al., 2007). Esse mecanismo envolveria a existência de receptores de glutamato de tipo NMDA em neurônios serotoninérgicos de projeção (GARTSIDE et al., 2007). Com isso, a ativação desses neurônios do NMnR pela administração de NMDA, causaria uma liberação de serotonina, que, na presença de receptores 5HT1a do NMnR, levaria a uma inibição da via NMnR – Hipocampo, atenuando os efeitos da exposição ao estresse.

Contrariamente aos efeitos do NMDA, o uso do antagonista glutamatérgico AP-7, promoveria uma inibição sobre o controle tônico que esses receptores exercem sobre o NMnR, que, por sua vez, resultaria em inibição da ativação dessa estrutura em resposta ao estresse. Conseqüentemente, o funcionamento da via NMnR – Hipocampo seria inibido, observando-se também uma atenuação dos efeitos da exposição ao agente estressor.

Dessa maneira, esperar-se-ia que o tratamento intra-NMnR previamente ao estresse também pudesse levar a uma atenuação dos efeitos comportamentais desse estressor, pelo bloqueio na aquisição dessa memória aversiva (estressante). Por outro lado, quando administrado antes do teste no NMnR de animais estressados previamente, o tratamento com NMDA ou AP-7 não seriam eficazes em atenuar os efeitos desse estressor.

Assim, a hipótese de nosso trabalho é a de que a atenuação dos efeitos comportamentais induzidos pela exposição a um agente estressor incontrolável envolvendo a neurotransmissão glutamatérgica no NMnR está condicionada ao momento em que a intervenção farmacológica ocorre.

2 OBJETIVOS

2 Objetivos:

2.1 Objetivo Geral:

Investigar se os diferentes momentos em que ocorre a interferência na neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores de tipo NMDA no núcleo mediano da rafe (NMnR), em relação ao estresse prévio inescapável (pré-teste do Modelo de Nado Forçado), pode atenuar as consequências comportamentais resultantes desse estresse.

2.2 Objetivos específicos:

1. Investigar os efeitos da intervenção na neurotransmissão glutamatérgica no NMnR antes da pré-exposição ao estresse na adaptação comportamental de ratos no teste do Nado Forçado.
2. Investigar os efeitos da intervenção na neurotransmissão glutamatérgica no NMnR antes do teste (re-exposição) na adaptação de ratos previamente expostos ou não ao estresse de Nado Forçado.

3 MATERIALS

3 Materiais

3.1 Animais

Para os experimentos desenvolvidos foram utilizados 160 ratos machos da linhagem Wistar, com 56 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério próprio do laboratório por 2 dias para ambientação, sendo colocados aos pares em caixas de acrílico (35x19x25cm) forradas com serragem, com livre acesso a água e comida. O biotério foi mantido em ciclo claro-escuro de 12x12 horas, com início do período claro às sete horas. A água dada aos animais foi filtrada e a temperatura ambiente foi mantida em $23\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ressalto que este projeto de pesquisa foi aprovado (com emissão de certificado) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de nosso campus (protocolo CEUA nº 07.993.53.9).

3.2 Materiais Gerais

Todos os materiais utilizados durante o projeto estão descritos a seguir, separados pelo tipo de procedimento no qual foram utilizados.

Para o teste do nado forçado foram utilizados:

- tanques cilíndricos de acrílico produzidos pela empresa BONTER, medindo 35cm de diâmetro e 65cm de altura, sendo a coluna de água mantida em 30cm e a temperatura da água em $25\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- toalhas de tecido para secagem dos animais após a exposição à água.

Para registro dos experimentos e análise dos mesmos foram utilizados:

- câmera filmadora JVC, modelo GR-SXM357UM
- dispositivos USB de captura de imagens
- microcomputador
- Software de captura de imagens “Debut Video Capture” da empresa NHC Software

Para a cirurgia estereotáxica foram utilizados:

- aparelho estereotáxico (marcas Stoelting e Insight);
- cânulas guia de 14mm com um nó de fio metálico soldado a cerca de 3,5mm de uma das pontas (para facilitar fixação e imobilização da cânula);
- cimento acrílico de uso odontológico para moldagem da prótese utilizada para proteção do crânio e fixação da cânula guia;
- pequenos parafusos para fixação do acrílico (usados em armação de óculos – ref. 208);
- mandris de aço inox (ref. 30) para impedir o entupimento da luz da cânula e evitar contato do tecido vivo com meio externo;
- solução hidroalcoólica 70% para desinfecção de todo o material utilizado;
- solução hidroalcoólica de iodo 2% para limpeza e desinfecção da região da cirurgia e pontos de injeção do anestésico local, antiinflamatório e antibiótico;
- instrumentos cirúrgicos;
- mini-retífica para perfuração óssea (marca Dremel);

As drogas utilizadas no processo cirúrgico foram:

- anestésico geral 2, 2, 2 tribromoetanol (Aldrich, EUA) a 2,5% (10 mL/Kg, intraperitoneal – i.p.);
- anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (1:50.000, Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,2ml);

- antibiótico veterinário Pentabiótico – 0,2ml intramuscular por animal (associação antibiótica de amplo espectro, marca Fort-Dodge, intramuscular);
- antiinflamatório Banamine (flunixin meglumina, analgésico, antiinflamatório e anti-térmico, 5mg/ml, 1ml/Kg de peso, sub-cutâneo – Schering-Plough).

Para o procedimento de injeções intracerebrais foram utilizados:

- agulhas odontológicas cortadas com 15,5mm para injeção intracerebral;
- segmentos de polietileno;
- seringas Hamilton de 10uL;
- bomba de infusão (INSIGHT e KdScientific);

Para a perfusão dos animais, foram utilizados:

- anestésico uretana 25% (5mL/kg, i.p., Sigma-Aldrich, USA);
- solução de formaldeído 10%;
- solução salina 0,9%;
- tubos de látex com 5mm de espessura para montagem do sistema de perfusão;
- agulhas de injeção, ligadas ao tubo de látex para injeção das soluções no organismo;
- bomba peristáltica para infusão das soluções;
- guilhotina da BONTER equipamentos para retirada da cabeça do animal;
- instrumentos cirúrgicos;

Para a preparação e análise do material histológico foram utilizados:

- aparelho criostato Leica, modelo CRYOCUT 1.800 para preparação dos cortes histológicos;

- lâminas de vidro previamente gelatinizadas para colocação e armazenamento dos cortes histológicos;
- microscópios Leica, modelo S.I.C.C.T. 9761 e modelo JANAMED 2 para análise do sítio de injeção nos cortes histológicos;

Todo o material metálico utilizado é inoxidável e foi limpo e desinfetado com álcool 70% antes e após os procedimentos.

3.3 Drogas Experimentais

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- NMDA (N-metil-D-aspartato) - (1 nmol/0,2µl; Sigma) agonista glutamatérgico para receptores NMDA; (MATSUYAMA et al 1996; BORELLI et al, 2005; FERREIRA-NETTO et al, 2007)

- AP-7 (ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico) - (3 nmoles/0,2µl) antagonista de receptores de glutamato de tipo NMDA (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000b; GUIMARÃES et al, 1991).

4 METODOLOGIA

4 Metodologia

4.1 Procedimento Experimental

Ao chegarem ao laboratório, os animais passaram por um período de ambientação de 2 dias no biotério próprio do laboratório. Passado esse período, os animais foram submetidos a diferentes procedimentos experimentais: cirurgia estereotáxica seguida por um período de recuperação, Pré-Teste e Teste do Nado Forçado, e perfusão para remoção do tecido cerebral para análise do sítio de injeção. Cada uma destas etapas segue explicada detalhadamente.

4.1.1 Cirurgia

Para a cirurgia estereotáxica, os animais foram anestesiados com 2,2,2-Tribromoetanol 2,5% (10 mL/Kg, i.p.) tricotomizados na região superior da cabeça e fixados pelos rochedos temporais no aparelho estereotáxico. Após a desinfecção dos locais de injeção com solução hidroalcoólica de iodo 2%, os animais receberam uma dose de Banamine (5 mg/ml 1 ml/kg do animal, subcutânea), de Pentabiótico (0,2 ml intramuscular) e de anestésico local (subcutânea). Em seguida foi feita uma incisão longitudinal no alto da cabeça de forma a expor o crânio e possibilitar a raspagem do periósteo. Removido o periósteo e procedida a anti-sepsia da região, foram feitas as medições referentes ao ponto de implante da cânula no NMnR a partir do bregma, usando as seguintes coordenadas adaptadas do Atlas de PAXINOS & WATSON (1997) (ântero-posterior: -7,3; lateral: 2,5; profundidade: -7,8; inclinação da haste: 18°). Utilizando uma broca (nº 2) de carbono para microretífica foram feitos dois furos superficiais (sem atravessar o osso) para colocação de dois parafusos usados para fixação do capacete acrílico e um furo no local do implante da cânula, de forma a permitir a inserção lenta da mesma até 1,5mm acima do sítio de injeção (7,8mm abaixo do crânio). Em seguida foi preparada uma massa de cimento acrílico que foi colocada sobre a abertura no topo da cabeça do animal de

forma a tampar toda a região aberta e a fixar-se nos parafusos e na cânula. Após secagem do cimento acrílico foi feita a colocação do mandril e sua fixação com cimento acrílico.

Figura 1: Procedimento cirúrgico. Foto mostrando o animal fixado ao aparelho estereotáxico com o crânio exposto para medições e implante da cânula-guia.

Gostaria de enfatizar que este procedimento sempre foi feito com o máximo de cuidado e higiene de forma a minimizar possíveis infecções e inflamações que possam surgir decorrentes do procedimento cirúrgico e impedir qualquer sofrimento do animal.

Após a cirurgia, os animais foram deixados em uma gaiola forrada com maravalha, sob luz incandescente de 60W, para recuperação da anestesia. Após recobrar a consciência e seus reflexos, os animais foram colocados em suas caixas, sendo mantidos por 5 a 7 dias sem qualquer manipulação experimental, com exceção da limpeza das caixas, para sua completa recuperação e restabelecimento.

4.1.2 Teste do nado forçado

Após o período de 5 a 7 dias para recuperação, os animais passaram pelo Teste do nado forçado de acordo com os grupos experimentais explicados adiante. Dependendo do grupo a qual pertencem, os animais receberam injeções em diferentes momentos, mas o procedimento do nado forçado foi o mesmo para todos.

Primeiramente os animais foram expostos ao Pré-Teste, quando são colocados por 15 minutos dentro do tanque acrílico do Nado Forçado com água. Cada animal foi retirado de sua caixa e levado para a sala do Nado Forçado onde foi exposto ao Pré-Teste e depois retirado, seco e colocado de volta a sua caixa, sendo sempre mantidos os mesmos pares de animais. Vinte e quatro horas após o Pré-Teste, o animal foi levado novamente à sala do Nado Forçado e exposto ao Teste. Durante o teste seu comportamento foi gravado por cinco minutos, após os quais o animal foi retirado, seco e devolvido a sua caixa até o momento da perfusão e retirada do encéfalo. Vale ressaltar que foram feitos experimentos onde os animais não foram expostos ao Pré-Teste, apenas ao Teste, como uma forma de avaliarmos se os efeitos das drogas são dependentes do estresse.

Figura 2: Comportamento de Imobilidade em animal previamente estressado e submetido ao teste de Nado Forçado. A foto mostra o momento em que o animal encontra-se totalmente imóvel, com apenas parte do focinho para fora da água. Note que o animal não toca o fundo

4.1.3 Análise Comportamental

A análise comportamental foi avaliada a partir das filmagens feitas durante os 5 minutos do Teste, e o desempenho dos animais foi avaliado através da latência para o aparecimento do primeiro episódio de imobilidade, assim como do tempo absoluto em que o animal permaneceu imóvel na água, fazendo apenas pequenos movimentos para se manter flutuando (tempo medido em segundos; vide figura 2).

4.1.4 Perfusão

Para a perfusão do tecido, os animais foram anestesiados com Uretana 25% (5ml/kg, i.p.) e levados a sala de perfusão. Para esse procedimento é feito um corte desde o abdômen do animal até tórax, atingindo o diafragma que é então perfurado e a caixa torácica é aberta, deixando o coração a mostra, é então colocada uma pinça na veia cava inferior e na artéria aorta abdominal de forma que a perfusão só ocorra na parte superior do corpo do animal, economizando reagentes e agilizando o processo. Em seguida uma agulha de perfusão, ligada a um sistema de abastecimento de soluções é inserida no ventrículo esquerdo do coração do animal e um corte é feito no átrio direito, pela agulha é bombeada solução salina (cerca de 250ml) de forma a remover o sangue e preparar o tecido, em seguida sendo bombeado uma solução de formaldeído 10% (cerca de 200ml) para fixação e preservação do tecido. Após esse procedimento a cabeça do animal é separada do corpo por uma guilhotina e o crânio é aberto para remoção do tecido encefálico, que foi preservado em formaldeído 10% até a preparação dos cortes histológicos.

4.1.5 Histologia

Para preparação dos cortes histológicos foi utilizado um aparelho para cortes de tecido congelado, Criostato (LEICA), para congelar o tecido e cortar as fatias. Cada corte foi feito com espessura de 40 micrômetros, e posteriormente foram analisados em microscópio e comparados com o Atlas de PAXINOS & WATSON (1997) para confirmação do sítio de injeção. Apenas os animais com sítio de injeção confirmado no NMnR foram utilizados para análise.

4.2 Grupos Experimentais

De acordo com o objetivo do projeto, investigamos a intervenção farmacológica na neurotransmissão glutamatérgica no NMnR em diferentes

momentos em relação ao estresse prévio e analisamos os resultados desta interferência na atenuação dos efeitos comportamentais do estresse.

Os diferentes momentos da intervenção farmacológica analisados foram logo antes da pré-exposição ao agente estressor em um grupo de animais, e em outro grupo de animais a intervenção ocorreu 24 horas após a exposição ao agente estressor, 5 minutos antes da re-exposição. O protocolo experimental do Nado Forçado, representado na Figura 3 demonstra os momentos da intervenção farmacológica.

Figura 3: Modelo esquemático para demonstrar eventos cronológicos do nado forçado e relacioná-los com os diferentes momentos de intervenção farmacológica. Os pontos 1, 2 e 3 correspondem respectivamente às intervenções farmacológicas ocorridas antes do Pré-Teste

De acordo com a Figura 3, no presente projeto, tivemos por objetivo analisar a intervenção farmacológica nos momentos 1 e 3, sendo a primeira parte do trabalho feitas com as microinjeções ocorrendo 5 minutos antes do Pré-Teste (momento 1) e a segunda parte do trabalho foi desenvolvida com as microinjeções sendo realizadas 24 horas após o Pré-teste e 5 minutos antes do Teste (momento 3). A intervenção feita no momento 2 (segundo a figura) foi avaliada em outro projeto, de Iniciação Científica, realizados neste mesmo laboratório no período entre 2006 a 2007, com dados não publicados ainda.

Figura 4: Esquema representando os Grupos Experimentais utilizados. Em cada Estudo temos um grupo estressado e um grupo controle sem estresse, ambos recebendo o tratamento farmacológico no momento referente ao próprio grupo a qual pertence.

4.2.1 Microinjeções

Independente do momento na qual a intervenção farmacológica foi realizada, esta sempre seguiu o mesmo procedimento e sempre foi dividida nos mesmos sub-grupos farmacológicos. Para uma eficaz análise do efeito farmacológico em um determinado tipo de receptor neuronal, é importante combinarmos grupos controles com drogas agonistas e antagonistas do receptor em questão, de forma a termos uma análise limpa de falsos positivos e negativos. Para isso usamos duas injeções em cada animal, com um intervalo de 5 minutos entre cada injeção, e 5 minutos de espera antes do teste subsequente. Os subgrupos são organizados em um grupo controle total, com duas injeções de solução salina (veículo), um grupo agonista, com a primeira injeção de solução salina e a segunda de NMDA (agonista farmacológico de receptores NMDA), um grupo antagonista com a primeira injeção de AP-7 (antagonista farmacológico de receptores NMDA) e a segunda de solução salina, e por ultimo um grupo antagonista-agonista com a primeira injeção de AP-7 e a segunda de NMDA. O protocolo de injeções está esquematizado na Figura 5.

Figura 5: Esquema mostrando as combinações de drogas e cronologia utilizados para intervenção farmacológica.

É importante ressaltar que as injeções intracerebrais foram realizadas com o auxílio de uma bomba de infusão, com velocidade controlada de 0,4µl por minuto. Terminada a injeção, a agulha foi mantida no sítio de injeção por mais 1 minuto, para evitar refluxo da droga.

4.3 Análise dos Dados

Os resultados foram analisados utilizando-se análise de variância de uma via (ONEWAY ANOVA) seguida do teste de Tukey. O valor de alfa foi estabelecido em 0,05.

5 RESULTADOS

5 Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados na figura e nos gráficos a seguir.

Na Figura 6 pode-se observar uma amostragem de sítios de injeção.

Figura 6: Figuras amostrais de cortes coronais com a localização dos sítios de injeção.

Os resultados obtidos dos testes comportamentais estão representados nas figuras adiante, na forma de gráfico comparativo.

5.1 Estudo 1 - Injeção prévia ao Pré-Teste

As Figura 7 e Figura 8 representam o desempenho dos animais que foram injetados previamente a serem submetidos ao estresse prévio e as barras mostram as médias + erro padrão da média (EPM) em segundos dos tempos de latência e dos tempos absolutos de imobilidade no teste do Nado Forçado após a administração de Salina + Salina (n=7), AP-7+Salina (n=9), AP-7 + NMDA (n=8) e Salina + NMDA (n=10).

A Figura 7 apresenta os valores de latência em segundos para o primeiro episódio de imobilidade, onde a análise estatística *post-hoc* (Teste de Tukey) indicou aumento significativo no tempo de latência do grupo AP-7 + Salina (101.9 ± 6.48) quando comparado ao grupo controle Salina + Salina (52.14 ± 9.45). Os grupos Salina + NMDA (65.6 ± 11.66) e AP-7 + NMDA (80.25 ± 9.44) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($F_{3,30}=4,687$; $p<0,05$).

Figura 7: O tratamento com AP-7 aumenta a Latência para Imobilidade no teste do Nado Forçado. As barras representam a média +EPM (erro padrão da média) da latência para o primeiro episódio de imobilidade em segundos. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo Salina+Salina (Oneway ANOVA seguida de Tukey, $p < 0,05$). Demais especificações no texto.

Ao analisar o tempo de imobilidade em segundos destes mesmos animais (Figura 8), os grupos AP-7 + Salina (103.9 ± 15.21) e AP-7 + NMDA (102.5 ± 11.03) apresentaram diminuição significativa quando comparados ao grupo controle Salina + Salina (168.0 ± 19.26), ao contrário do grupo Salina + NMDA (160.7 ± 10.06), que não apresentou diferença significativa ($F_{3,30} = 5,388$; $p < 0,05$).

Figura 8: O tratamento com AP-7 diminui o Tempo Total Imóvel no teste do Nado Forçado. As barras representam a média +EPM (erro padrão da média) do tempo total imóvel em segundos. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo Salina+Salina (Oneway ANOVA seguida de Tukey, $p < 0,05$). Demais especificações no texto.

O desempenho dos animais que não foram submetidos a um estresse prévio e que receberam o tratamento i.c. 24 horas antes do teste está representado nas Figura 9 e Figura 10.

Na Figura 9, o tempo de latência observado no grupo controle Salina + Salina (203.4 ± 11 , $n=5$) foi próximo aos valores obtidos para os grupos Salina + NMDA (212.5 ± 22.8 , $n=6$), AP-7 + Salina (194.6 ± 41.5 , $n=5$) e AP-7 + NMDA (240.5 ± 30.4 , $n=4$), não apresentando diferença significativa entre eles ($F_{3,19}=0,4124$; $p < 0,05$).

Figura 9: Os tratamentos com NMDA e/ou AP-7 não alteram o Tempo de Latência para Imobilidade no teste do Nado Forçado em animais não estressados. Demais especificações como na Figura 7 e no texto.

Na Figura 10 vemos que o tempo total de imobilidade observado no grupo Salina + Salina (40.8 ± 4.6 , $n=5$) não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos Salina + NMDA (53.7 ± 13.6 , $n=6$), AP-7 + Salina (22.4 ± 7.7 , $n=5$) e AP-7 + NMDA (25.5 ± 12.6 , $n=4$) ($F_{3,19}=1,9533$; $p<0,05$).

Figura 10: Os tratamentos com NMDA e/ou AP-7 não alteram o Tempo Total Imóvel no teste do Nado Forçado em animais não estressados. Demais especificações como na Figura 8 e no texto.

5.2 Estudo 2 - Injeção prévia ao Teste

As Figura 11 e Figura 12 representam o desempenho dos animais que foram submetidos ao estresse prévio e injetados previamente ao Teste. Como nas figuras anteriores, as barras mostram as médias + erro padrão da média (EPM) em segundos dos tempos de latência e dos tempos absolutos de imobilidade no teste do Nado Forçado após a administração de Salina + Salina (n=10), AP-7+Salina (n=10), AP-7 + NMDA (n=13) e Salina + NMDA (n=11).

A Figura 11 apresenta os valores de latência em segundos para o primeiro episódio de imobilidade, onde a análise estatística *post-hoc* (Teste de Tukey) indicou aumento significativo no tempo de latência dos grupos AP-7 + Salina (204.6 ± 27.9) e AP-7 + NMDA (237.6 ± 17.1) quando comparado ao grupo controle Salina + Salina (43.8 ± 7.7). O grupo Salina + NMDA (78.5 ± 18.4) não apresentou diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($F_{3,43}=25.06$; $p<0.05$).

Figura 11: O tratamento com AP-7 aumenta o Tempo de Latência para Imobilidade no teste do Nado Forçado. Demais especificações como na Figura 7 e no texto.

Ao analisar o tempo de imobilidade dos mesmos animais (Figura 12), os grupos AP-7 + Salina (23.7 ± 8.3), AP-7 + NMDA (14.2 ± 6.1) e Salina + NMDA (61.3 ± 10.6), apresentaram diminuição significativa quando comparados ao grupo controle Salina + Salina (128.4 ± 10.98) ($F_{3,43}=32.58$; $p<0.05$).

Figura 12: O tratamento com NMDA e com AP-7 diminuíram o Tempo Total Imóvel no teste do Nado Forçado. Demais especificações como na Figura 8 e no texto.

O desempenho dos animais que não foram submetidos a um estresse prévio e que receberam o tratamento i.c. 5 minutos antes do teste está representado nas Figura 13 e 14.

Na Figura 13 observamos que não houve variação significativa no tempo de Latência para o primeiro episódio de imobilidade entre os grupos Salina + NMDA (186.7 ± 17.1 , $n=6$), AP-7 + Salina (187.7 ± 31.8 , $n=6$) e AP-7 + NMDA (232 ± 25.4 , $n=6$), quando comparados ao grupo controle Salina + Salina (221.6 ± 32.8 , $n=5$) ($F_{3,22}=0.7186$; $p<0,05$).

Figura 13: Os tratamentos com NMDA e/ou AP-7 não alteram o Tempo de Latência para Imobilidade no teste do Nado Forçado em animais não estressados. Demais especificações como na Figura 7 e no texto.

Da mesma forma, na 14 vemos que o tempo total de imobilidade observado no grupo Salina + Salina (29.8 ± 16.3 , $n=5$) não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos Salina + NMDA (34.2 ± 5.7 , $n=6$), AP-7 + Salina (23.5 ± 12.34 , $n=6$) e AP-7 + NMDA (18.8 ± 7.7 , $n=6$) ($F_{3,22}=0.4093$; $p<0,05$).

Figura 14: Os tratamentos com NMDA e/ou AP-7 não alteram o Tempo Total Imóvel no teste do Nado Forçado em animais não estressados. Demais especificações como na Figura 8 e no texto.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

6 Discussão e Conclusão

6.1 *Discussão*

O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito da neurotransmissão glutamatérgica no Núcleo Mediano da Rafe em diferentes momentos em relação ao agente estressor nos mecanismos envolvidos na adaptação comportamental a um evento estressor inescapável (Teste do Nado Forçado). Para tanto utilizamos o Teste do Nado Forçado, proposto por Porsolt (1977), onde o animal é exposto a um tanque com água sem possibilidade de fuga, sendo obrigado a nadar para se manter na superfície. Após sucessivas tentativas de escapar, o animal acaba por ficar imóvel. Em uma subsequente exposição, o início da imobilidade se dará mais rapidamente. Este estado tem sido chamado de desespero comportamental, e é interpretado como uma desistência de escapar da situação aversiva em que se encontra e tem sido usado como uma das ferramentas experimentais para o estudo da depressão (PORSOLT et al., 1977, 1978, 1981).

Dados da literatura (PORSOLT ET AL., 1977, 1978, 1981; PADOVAN; GUIMARÃES, 2004) e de nosso laboratório mostram que a pré-exposição ao Nado Forçado promove uma diminuição no tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade, assim como um aumento no tempo total que o animal permanece imóvel, quando o mesmo é novamente exposto a esta situação, em comparação a animais não estressados previamente. Essa diferença pode ser explicada se considerarmos que a exposição do animal a um estressor incontrolável/inescapável induz alterações no comportamento dos animais, modificando a reatividade dos mesmos quando expostos a uma nova situação. Nesse sentido, poderíamos imaginar que a exposição a estressores inescapáveis desencadeariam a formação de uma memória aversiva no animal, que seria evocada no momento da exposição a este mesmo contexto ou a outro de novidade.

Outros trabalhos mostraram que um mesmo mecanismo pode causar mudanças comportamentais diferentes dependendo do momento em que ocorre a intervenção farmacológica (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000, 2003), sendo este um dos principais fatores que nos levaram a hipótese do presente trabalho. Assim, na primeira etapa deste trabalho, avaliamos o efeito do tratamento nos animais previamente a exposição dos destes ao agente estressor, momento este que seria antes da formação de uma possível memória aversiva. Na segunda etapa do trabalho, avaliamos o efeito do tratamento no comportamento dos animais 24 horas após a exposição destes ao agente estressor e logo antes do Teste, momento este o qual já existira uma memória aversiva diretamente relacionada ao agente estressor. Além disso, experimentos com intervenção farmacológica logo após a exposição ao agente estressor foram realizados anteriormente durante estágio de Iniciação Científica (processo FAPESP 06/55.846-8), e estão sendo preparados para publicação, mas os dados obtidos estão apresentados no Anexo 1, de forma a permitir comparações importantes para a discussão dos resultados.

Em nosso estudo, observamos que a exposição prévia ao estresse de Nado Forçado promoveu alterações comportamentais significativas, como evidenciado no grupo de animais tratados com Salina + Salina (grupo controle, figuras 3 e 4 para tratamento 24 horas antes do Teste, e 7 e 8 para tratamento logo antes ao Teste), que apresentou um baixo tempo de latência e um alto tempo de imobilidade, quando comparado ao grupo de animais não estressados previamente e que receberam o mesmo tratamento (Figuras 5 e 6, para tratamento 24 horas antes do Teste, e 9 e 10 para tratamento logo antes ao Teste). Assim sendo, esses resultados corroboram os dados descritos na literatura (PORSOLT et al., 1977, 1978, 1981), mostrando os efeitos comportamentais (desespero comportamental) da exposição prévia a um estressor inescapável, servindo como linha de base comparativa para os demais grupos de nosso estudo.

Entretanto, quando animais estressados previamente receberam o tratamento intra-NMnR com o antagonista de receptores NMDA, o AP-7 (AP-7 + Salina), antes da exposição ao agente estressor, observamos um aumento no tempo de latência, juntamente com uma diminuição do tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle. Esses resultados mostram que o desespero comportamental foi atenuado pela administração prévia ao estresse de um antagonista de receptores

NMDA. Por outro lado, ao administrarmos o NMDA (agonista de NMDAr), ainda previamente a exposição ao agente estressor, no NMnR de animais expostos ao estresse não observamos alterações em relação ao grupo controle Salina nos tempos de latência e de imobilidade.

Já o tratamento intra-NMnR com o antagonista AP-7 seguido pelo agonista NMDA (5 min. intervalo) também não alterou significativamente o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade. Curiosamente, observou-se diminuição significativa do tempo total de imobilidade dos animais.

Ao analisarmos os animais cujo tratamento foi realizado previamente ao Teste, ou seja, 24 horas após a exposição ao agente estressor, notamos que a administração do antagonista AP-7 seguida de Salina e AP-7 seguida do agonista NMDA causou um aumento significativo no tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade e também uma diminuição significativa no tempo total de imobilidade destes animais quando comparados ao grupo controle Salina + Salina, mostrando uma atenuação do efeito estressor causado pelo desespero comportamental.

A administração do agonista glutamatérgico NMDA não apresentou variação na latência para imobilidade quando comparado ao grupo controle Salina + Salina, mas apresentou uma diminuição significativa no tempo total imóvel, mostrando algum efeito em amenizar o desespero comportamental.

Os mecanismos envolvidos nos efeitos observados com os diferentes tratamentos intra-NMnR previamente a exposição ao estresse de Nado Forçado ainda não estão completamente elucidados.

Dados¹ anteriores de nosso laboratório mostraram os efeitos dos diferentes tratamentos administrados após a exposição prévia ao Nado Forçado (Anexo 1). Nesta condição experimental, o tratamento tanto com NMDA quanto com AP-7 foi eficaz em atenuar os efeitos da exposição ao estresse. Resultados semelhantes também foram observados após a administração conjunta de AP-7+NMDA.

Segundo a teoria proposta por Deakin e Graeff (1991), falhas no funcionamento da via NMnR-HD são responsáveis pela não adaptação do animal

¹ Dados obtidos durante projeto de iniciação científica (2006-2007), processo FAPESP 06/55.846-8

(ou do ser humano) a estressores crônicos, levando ao aparecimento de quadros de desamparo aprendido (ou depressão). Nessa via, os receptores de tipo 5-HT_{1a} teriam função importante por inibir a ativação da via, consequentemente causando a desconexão das memórias aversivas relacionadas ao estresse, permitindo a adaptação do animal frente ao evento aversivo. Vários trabalhos na literatura têm apontado para uma interação entre os sistemas serotoninérgico e glutamatérgico nos núcleos da rafe, assim como dos efeitos dessa interação em estruturas prosencefálicas como o córtex pré-frontal, e estruturas límbicas como o hipocampo e a amígdala (TAO; AUERBACH, 1996; GARTSIDE et al., 2007; MOKLER et al., 2009). Nesse sentido, dados indicam que, no NMnR, os NMDAr parecem controlar a liberação de serotonina nessas estruturas, inclusive no próprio NMnR (TAO; AUERBACH, 1996; WEDZONY et al., 1997; GARTSIDE et al., 2007; MOKLER et al., 2009). A serotonina liberada, por sua vez, atuaria sobre auto-receptores de tipo 5-HT_{1a}, inibindo a ativação da via NMnR-HD pelo agente estressor.

Isso posto, é possível que o tratamento com NMDA após o estresse promoveria um aumento nas concentrações de serotonina no próprio NMnR, levando a uma inibição da via e, consequentemente, a uma atenuação dos efeitos da exposição ao estresse.

Outra explicação é que poderia complementar a anterior refere-se à existência de um mecanismo de controle tônico sobre o funcionamento do NMnR mediado por neurônios glutamatérgicos (TAO; AUERBACH, 2003). Esse mecanismo atuaria sobre o funcionamento do NMnR e, portanto, da via NMnR-Hipocampo, assim como sobre a liberação de serotonina no próprio NMnR e também no Hipocampo (TAO; AUERBACH, 2003; GARTSIDE et al., 2007; MOKLER et al., 2009), mecanismos esses que seriam responsáveis pela adaptação a estímulos aversivos/estressantes repetidos. Esse mecanismo envolveria a existência de receptores de glutamato de tipo NMDA em neurônios serotoninérgicos locais (GARTSIDE et al., 2007). Com isso, a ativação desses neurônios do NMnR pela administração de NMDA, causaria uma liberação de serotonina, que, na presença de receptores 5-HT_{1a} do NMnR, levaria a uma inibição da via NMnR – Hipocampo, atenuando os efeitos da exposição ao estresse. Além disso, é possível que dentro do próprio NMnR neurônios glutamatérgicos enviem pequenas projeções sobre os neurônios serotoninérgicos de projeção ao Hipocampo Dorsal, modulando a

atividade destes últimos. Em outros dados de nosso laboratório, temos que a injeção intra-NMnR de 8-OH-DPAT, um agonista seletivo de receptores 5-HT_{1a}, antes da pré-exposição, logo após a pré-exposição e antes do Teste do nado forçado, foi capaz de reverter os déficits comportamentais induzidos pelo estressor (ALMEIDA, PEREIRA E PADOVAN, *in prep*; TROVÓ, TOKUMOTO E PADOVAN, *in prep*) corroborando a explicação acima.

Se existente tal circuitaria, o uso do antagonista glutamatérgico AP-7, promoveria uma inibição sobre o controle tônico que esses receptores exercem sobre o NMnR, que, por sua vez, resultaria em inibição da ativação dessa estrutura em resposta ao estresse. Conseqüentemente, o funcionamento da via NMnR – Hipocampo seria inibido, observando-se também uma atenuação dos efeitos da exposição ao agente estressor. Este funcionamento complexo poderia explicar os resultados observados com o AP-7 administrado previamente ao estresse.

Em outro conjunto de experimentos, foram feitas injeções dos diferentes tratamentos intra-NMnR 24 horas antes do teste sem, no entanto, expor o animal ao estresse prévio. Nesse grupo, os tratamentos envolvendo injeções de AP-7 e/ou NMDA não alteraram o comportamento dos animais, quando os mesmos foram testados 24 horas depois da injeção. Esses resultados estão de acordo com o esperado e reforçam a idéia de que as alterações comportamentais observadas são decorrentes de interações entre o sistema glutamatérgico mediado por NMDAr e as alterações induzidas pela exposição prévia ao estresse de Nado Forçado. Assim, em animais não estressados, o tratamento com essas drogas não alteraria o comportamento dos mesmos, uma vez que, no momento do teste, os efeitos desencadeados pela ação destes fármacos já teriam se dissipado. Por outro lado, temos ainda um conjunto de testes no qual os animais receberam as injeções cinco minutos antes do Teste, sem terem sido expostos ao estresse prévio, e que não apresenta efeitos comportamentais na latência e no tempo total de imobilidade durante o teste. Esses resultados descartam a possibilidade do efeito das drogas ter se dissipado, já que as injeções foram feitas logo antes do Teste, mostrando realmente que as alterações comportamentais observadas foram decorrentes da interação entre o sistema glutamatérgico e o estresse ao qual os animais foram expostos.

Em conjunto, nossos dados mostraram que o antagonista de receptores NMDA de glutamato no NMnR, o AP-7, atenuou os efeitos da pré-exposição ao estresse de Nado Forçado, quando administrado imediatamente antes da exposição a este estressor e também quando administrado logo antes do Teste comportamental. Já o tratamento com o próprio agonista destes receptores, o NMDA, não alterou o comportamento dos animais quando administrado previamente ao estresse de Nado Forçado (pré-exposição), mas causou diminuição do tempo total de imobilidade dos animais quando administrado logo antes do Teste comportamental. Além disso, o tratamento com estas drogas não alterou o comportamento do grupo de animais não estressados, reforçando a importância entre as consequências desencadeadas pela exposição ao agente estressor e o tratamento farmacológico realizado.

6.2 Conclusão

- A exposição ao estresse de nado forçado leva a alterações no comportamento do animal quando re-exposto ao mesmo contexto vinte e quatro horas depois;
- A neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores NMDA no NMnR está envolvida com o mecanismo de adaptação ao estresse inescapável;
- O bloqueio de receptores NMDA no NMnR, antes da exposição ao estresse e 24 horas após a exposição, causa atenuação dos efeitos comportamentais dessa exposição;
- Existe um mecanismo complexo responsável pelo controle da adaptação ao estresse mediado por receptores NMDA de glutamato, que pode envolver ativação tônica dos neurônios glutamatérgicos ou a presença de interneurônios glutamatérgicos de controle, com receptores NMDA, dentro do NMnR;
- Nenhum dos tratamentos farmacológicos causou mudanças comportamentais independentes de uma exposição ao agente estressor;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 Referências bibliográficas selecionadas:

ADELL, A.; CASANOVAS, J.M.; ARTIGAS, F. Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. **Neuropharmacology**, 36(4-5):735-741, 1997.

ANDRADE, T.G.; GRAEFF, F.G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2001 Sep;70(1):1-14.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.179, p.641-668, 1978.

AZMITIA, E.C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v.56, n.5, p.413-424, 2001.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083-1152, 1999.

BLIER, P. The pharmacology of early-onset antidepressant drugs. **European Neuro-Psychopharmacology**. 13: 57-66, 2003.

BORELLI, K.G.; GÁRGARO, A.C.; DOS SANTOS, J.M.; BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. **Neurosci Lett**. 387(2):105-10. 2005.

BRIONES-ARANDA. A.; ROCHA, L.; PICAZO, O. Influence of forced swimming stress on 5-HT_{1A} receptors and serotonin levels in mouse brain. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 275-281, 2005.

CASPI, A.; SUGDEN, K.; MOFFITT, T.E. Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science** 301 (5631): 386–389, 2003.

CUCHE H, GERARD A. Não aguento mais: um guia para compreender e combater a depressão. 2ª edição, Editora Papyrus, 1994.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence, **Journal of Psychopharmacology**, 5; 305-315, 1991.

Diagnostic and statistical manual IV. American psychiatric press, Washington, D.C., 2000.

DUBOVSKY, S.L.; DUBOVSKY, A.N. **Transtornos do Humor**. São Paulo, Artmed, 2004

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. **Exp Neurol**. 204(2):693-704. 2007.

FILIP, M.; BADER, M.; Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacological reports**. Sep-Oct;61(5):761-77, 2009.

GARTSIDE, S.E.; COLE, A.J.; WILLIAMS, A.P.; MCQUADE, R.; JUDGE, S.J. AMPA and NMDA receptor regulation of firing activity in 5-HT neurons of the dorsal and median raphe nuclei. **Eur J Neurosci**. 2007 May 17

GRAEFF, F.G. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2ª edição. São Paulo, EPU, 1990.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. 1ed. São Paulo. Atheneu, 1999.

GRAEFF, F.G.; GUIMARAES F.S.; DE ANDRADE, T.G.; DEAKIN, J.F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**. 54(1):129-41, 1996.

GREENBERG, P.E.; KESSLER, R.C.; BIRNBAUM, H.G.; LEONG, S.A.; LOWE, S.W.; BERGLUND, P.A.; COREY-LISLE, P.K. The economic burden of depression in the United States: How did it change between 1990 and 2000? **Journal of Clinical Psychiatry**, 62, 1465–1475, 2003.

GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; MOLINA, V. A. Mood disorders. In: BRANDÃO, M. L & GRAEFF, F. G. **Neurobiology of mental disorders**. New York: Nova Science Publishers,. Cap. 5, p. 95-123, 2006

GUIMARÃES, F.S. Distúrbios afetivos. In: GRAEFF, F.G. & BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo, Lemos Editorial & Gráficos Ltda, p.79-107, 1997.

GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology**, 103(1):91-4, 1991.

HAEFFEL, G.J.; GETCHELL, M.; KOPOSOV, R.A.; YRIGOLLEN, C.M.; DEYOUNG, C.G.; KLINTEBERG, B. Association between polymorphisms in the dopamine transporter gene and depression: Evidence for a gene-environment interaction in a sample of juvenile detainees. **Psychological Science**. Volume 19, Number 1, pp. 62-69(8), January 2008.

HORNUNG, J.P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal Chemical Neuroanatomy**, v.26, p.331-343, 2003.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neuroscience**, 29(9):496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**. 68(3): 285-316, 1997.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism**, v. 54, p. 24-27, Suppl 1, 2005.

KENNET, G.A.; DICKINSON, S.L.; CURZON, G. Enhancement of some 5-HT dependent behavioral responses following repeated immobilization in rats. **Brain Res**, 330: 253-263, 1985.

KENNET, G.A.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. **European Journal of Pharmacology**, 134: 265-274, 1987.

KESSLER, R.C.; CHIU, W.T.; DEMLER, O.; WALTERS, E.E. Prevalence, Severity, and Comorbidity of 12-Month *DSM-IV* Disorders in the National Comorbidity Survey Replication **Arch Gen Psychiatry**. 62:617-627, 2005.

MAGALHAES, A.C.; HOLMES, K.D.; DALE, L.B.; COMPS-AGRAR, L.; LEE, D.; YADAV, P.N.; DRYSDALE, L.; POULTER, M.O.; ROTH, B.L.; PIN, J.P.; ANISMAN, H.; FERGUSON, S.S., CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT₂ receptor signaling. **Nature Neuroscience**. 11 apr 2010.

MATSUYAMA, S.; NEI, K.; TANAKA, C.; Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT_{1A} receptors in guinea pig dentate gyrus. **Brain Res.** 728(2):175-80.1996

MCENTEE, W.; CROOK, T. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. **Psychopharmacology**, 111 (4): 391-401, 1993.

MOKLER, D.J.; DUGAL, J.R.; HOFFMAN, J.M.; MORGANE P.J. Functional interrelations between nucleus raphé dorsalis and nucleus raphé medianus: A dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. **Brain Research Bulletin**, 78: 132-138, 2009.

MONROE, S.M.; SIMONS, A.D. Diathesis-stress theories in the context of life stress research: Implications for depressive disorders. **Psychological Bulletin**, 110, 406–425, 1991.

MORENO, R.A.; MORENO. D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Brasileira de Psiquiatria**, Suplemento Depressão, v21, p.24-40, 1999.

MURRAY, C.J.L.; LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden Disease Study. **The Lancet** 349, 1498–1504, 1997.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**. 34: 13-25, 2002.

NETTO, S.M.; GUIMARAES, F.S. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience. **Behav Brain Res.** 77(1-2):215-8, 1996.

NETTO, S.M.N.; SILVEIRA, R.; COIMBRA, N.C.; JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.S. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 26:1135-1141, 2002.

ÖGREN, S.O; ERIKSSON, T.M; ELVANDER-TOTTIE, E; D'ADDARIO, C; EKSTROM, J.C.; SVENNINGSSOM, P.; MEISTER, B.; KEHR, J.; STIEDL, O. The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. **Behavioral Brain Research**, v. 195, p. 54-77, 2008.

PADOVAN, C. M., GUIMARÃES, F. S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** , 77: 15-19, 2003.

PADOVAN, C. M., GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** , 67: 325-330, 2000b.

PADOVAN, C.M.; GUIMARAES, F.S. ,Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res.** 33(1):79-83 Jan 2000a.

PADOVAN, C.M.; GUIMARAES, F.S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 77(1):15-9, Jan 2004.

PADOVAN, C.M.; GUIMARAES, F.S. Attenuation of behavioral consequences of immobilization stress by intra-hippocampal microinjection of zimelidine. **Braz J Med Biol Res.** 26(10):1085-9, Oct 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, USA. 1997.

PORSOLT, R.D. Behavioral despair test, In: Enna.S.J.; et al (eds): **Antidepressants: Neurochemical, behavioral and clinical perspectives**, Raven Press, 121-139, 1981.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; HALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new models sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, 47: 379-391, 1978.

PORSOLT, R.D.; LEPICHON, M.; HALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive antidepressant treatments. **Nature**, 266; 730-732, 1977.

POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am. J. Psych.**, 149(8): 999-1010, 1992.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behav Brain Res.** (1-2):241-6, 1997

SARTORIUS, N. The economic and social burden of depression. **J Clin Psychiatry** 62 (suppl 15), 8-11, 2001.

SELYE, H. History of the Stress Concept. Ch. 2 In GOLDBERGER, L.; BREZNITZ, S. *Handbook of Stress: Theoretical and Clinical Aspects*. Free Press, 1982.

SPITZER, R.L.; KROENKE, K.; LINZER, M.; HAHN, S.R.; WILLIAMS J.B.; DEGRUY 3rd, F.V. Health-related quality of life in primary care patients with mental disorders. Results from the PRIME-MD 1000 Study, **Jama** 274, 1511–1517, 1995.

SPITZER, R.L.; WILLIAMS, J.B.; KROENKE, K.; LINZER, M.; DEGRUY 3rd, F.V.; HAHN, S.R. Utility of a new procedure for diagnosing mental disorders in primary care. The PRIME-MD 1000 study, **Jama** 272, 1749–1756, 1994.

STEWART, W.F.; RICCI, J.A.; CHEE, E.; HAHN, S.R.; MORGANSTEIN, D. Cost of lost productive work time among US workers with depression, **Jama** 289 , pp. 3135–3144, 2003.

TAO, R.; AUERBACH, S.B. Differential effect of NMDA on extracellular serotonin in rat midbrain raphe and forebrain sites. **J Neurochem**, 66(3): 1067-75, 1996.

TAO, R.; AUERBACH, S.B. Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. **Brain Res.** 24;961(1):109-20, Jan 2003.

VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **Journal Comparative Neurology**, v. 407, p. 555-82, 1999.

WEDZONY, K.; MACKOWIAK, M.; CZYRAK, A.; FIJAL, K.; MICHALSKA, B. Single doses of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, increase the number of 5-HT_{1A} serotonin receptors in the rat brain. **Brain Res.** 756(1-2):84-91, May 1997.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, 45: 425-455, 1990.

WILLNER, P. Depression, a psychological synthesis. **A Wiley-Interscience Publication**. Eds. John Wiley and sons, 1985.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, 83: 1-16, 1984.

ZANATTA, M. S.; QUILLFELDT, J. H.; SCAEFFER, E.; SCHMITZ, P. K.; QUEVEDO., J.; MEDINA, J. H. and IZQUIERDO, I.. Involvement of the hippocampus, amygdale, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 235-240, 1997.

ANEXO 1

Anexo 1: Os tratamentos com NMDA e/ou AP-7 injetados logo após a pré-exposição ao estresse aumentam o Tempo de Latência para Imobilidade e diminuem o Tempo Total Imóvel no teste do nado forçado. As barras em branco representam a média +EPM (erro padrão da média) da latência para o primeiro episódio de imobilidade em segundos, enquanto que as barras em preto representam a média +EPM do tempo total imóvel em segundos. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo Salina+Salina (Oneway ANOVA seguida de Tukey, $p < 0,05$).