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

NAYANNE BECKMANN BOSAIPO

Padrão de atividade locomotora e expressão de EAAC1 e GLT1 no córtex pré-frontal e entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame

Ribeirão Preto

2012

NAYANNE BECKMANN BOSAIPO

Padrão de atividade locomotora e expressão de EAAC1 e GLT1 no córtex pré-frontal e entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientadora: Profª. Drª. Cláudia Maria Padovan

Ribeirão Preto

2012

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.

Bosaipo, Nayanne Beckmann

Padrão de atividade locomotora e expressão de EAAC1 e GLT1 no córtex pré-frontal e entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame. 2012.

106 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Padovan, Claudia Maria.

1. Isolamento Social. 2. Esquizofrenia. 3. Hiperatividade Locomotora. 3. EAAC1. 4. GLT1. 5. Córtex pré-frontal e entorrinal

Nome: Bosaipo, Nayanne Beckmann

Título: Padrão de atividade locomotora e expressão de EAAC1 e GLT1 no córtex pré-frontal e entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Assinatura:_____

AOS MEUS PAIS,

Com muito amor, pelo incentivo e apoio, e pelos sacrifícios que fizeram para que eu sempre tivesse os melhores recursos para alcançar o sucesso.

Agradecimentos

Por muitas vezes senti que a investigação científica fosse de certo modo um processo solitário. Felizmente notei que se tratava de um engano. A construção de uma dissertação reúne a colaboração de várias pessoas, a quem agradeço sinceramente pelo apoio e confiança. Sem esta ajuda, este trabalho não seria possível. Sendo assim agradeço:

À Profª. Dra. Cláudia Maria Padovan, orientadora deste trabalho, que durante esses anos de convivência muito me ensinou sobre ciência, contribuindo para meu crescimento intelectual, científico e pessoal.

À Profª. Dra. Maria Luiza Nunes Mamede Rosa, também orientadora deste trabalho, pela orientação, os ensinamentos inestimáveis, o carinho, a paciência e apoio. Sou extremamente grata pelo zelo e dedicação com que tratou este trabalho. Sem a sua contribuição nada disso seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, aos Professores e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade e o ensino. Especialmente, agradeço á secretária, Renata, pela ajuda, compreensão e pelos momentos de descontração que eu não poderia deixar de citar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Fundação Padre Albino pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Às técnicas Thalita, bioterista do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e Depressão, e Melina do Laboratório de Neurociências por me ensinar cuidadosa e pacientemente as técnicas fundamentais para este trabalho. Agradeço também aos técnicos e docentes da FORP que tornaram possível a realização do experimento de fluorescência e a obtenção das microfotografias.

Aos colegas e amigos de laboratório, especialmente à Kelly, Diego e Helene, com quem muito aprendi e partilhei. Agradeço o tempo e paciência que

tiveram para me apresentar o ambiente do laboratório de pesquisa, o auxílio, a parceria, os momentos de companheirismo e principalmente pela amizade.

Aos amigos da pós-graduação, em especial à “quadrilha do pão-de-queijo”, que partilharam da coragem de buscar a pós-graduação em psicobiologia na USP, pelo apoio e amizade.

Agradeço também aos demais amigos, os que eu já trazia comigo de outras andanças e os que cativei em Ribeirão Preto. Obrigada pelo carinho e suporte e principalmente pelo esforço para me manter conectada com o restante do mundo, sempre me dando fôlego para seguir com os estudos.

Ao Pablo por estar comigo em tudo. Pelo seu cuidado, apoio, paciência, dedicação e carinho que só o amor conseguem explicar. Não existem palavras para agradecer à você e à sua família.

Aos meus irmãos, Maira e Leonardo, por acompanharem, apoiarem e incentivarem desde cedo a minha busca pelo conhecimento. Amo muito vocês.

Aos meus pais, agradeço pelo amor, pelo suporte irrestrito, e pela compreensão da minha ausência. Sou grata pelas orações que sempre me protegeram e iluminam a minha vida.

A Deus, por tudo.

A todos, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, muito obrigada por continuarem a me acompanhar nesta jornada e por estimular a minha busca pelo conhecimento guiada pela pesquisa científica.

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Bosaipo, N. B. (2012). Padrão de atividade locomotora e expressão de EAAC1 e GLT1 no córtex pré-frontal e entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O estresse por isolamento social aplicado em ratos a partir do desmame e mantido durante o desenvolvimento encefálico tem sido utilizado como um modelo experimental de desordens psiquiátricas como a esquizofrenia. Tem sido demonstrado que o isolamento induz alterações morfológicas, comportamentais (como hiperatividade em um novo ambiente) e neuroquímicas semelhantes àquelas que ocorrem em humanos esquizofrênicos. Evidências sugerem que as sinapses glutamatérgicas sejam o sitio primário das anormalidades que ocorrem na esquizofrenia, sendo as alterações dopaminérgicas secundárias às glutamatérgicas. Nesse sentido, alterações nos mecanismos de regulação desta neurotransmissão pelos transportadores de glutamato podem contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção da esquizofrenia. Neste estudo analisamos o padrão de atividade locomotora e a expressão de transportadores de glutamato (EAAC1 e GLT1) no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame. Ratos Wistar machos (PND21) foram aleatoriamente alocados em 2 grupos (n=11-12): controle (agrupados, 3 animais/caixa) ou isolados (1 animal/caixa) por 10 semanas. Os animais foram testados no campo aberto (arena) durante 20 min. e registrados: números de cruzamentos (exploração horizontal), número de levantamentos (exploração vertical) e tempo despendido, tanto no centro como na periferia da arena. Os grupos foram comparados utilizando ANOVA ou teste "*t*" de Student (significante quando $p \leq 0.05$). Os animais foram anestesiados (uretana-Sigma, 25%, 5ml/kg), perfundidos e os encéfalos retirados, congelados e posteriormente utilizados nos experimentos de imunoistoquímica. Secções (40µm) do córtex pré-frontal (CPF) e córtex entorrinal (CE) foram utilizadas para o estudo da expressão de EAAC1 e GLT1. A criação em isolamento induziu hiperatividade, com um aumento no número total de cruzamentos em relação aos animais agrupados ($F_{1,22}$=0,38; p<0,05), sendo mais consistente na periferia da arena e após 5 minutos de teste (73%, ($F_{1,22}$=14,08; p<0,001). Em contraste, o isolamento induziu redução no número total de levantamentos ($F_{1,22}$=0,27; p=0,05), principalmente no centro da arena (58%, $F_{1,22}$=12,48; p<0,01), nos primeiros 15 minutos de teste e significante no 1° e 3° blocos de tempo (BT1 e BT3). Na periferia o isolamento induziu aumento significante no número de levantamentos em BT2 e BT3. O tempo despendido no centro e na periferia da arena pelos animais criados em isolamento foi, respectivamente, reduzido (54%; $F_{1,22}$=11,11; p<0,001) e aumentado (65%; $F_{1,22}$=11,20; p<0,01) quando comparados aos animais agrupados. A expressão de EAAC1 foi significantemente aumentada pelo isolamento no CPF (38%, t= 2,730, p=0,017). Em contraste, nenhuma diferença foi encontrada no CE (t= 1,892; p= 0,081). O isolamento não induziu alteração no número de células

imunopositivas para GLT1 no CPF (t=-1,28; p=0,21). Entretanto, marcação fluorescente de GLT1 foi observada associada a células gliais e neuroniais do CPF e CE. Os resultados comportamentais sugerem: i) a hiperatividade locomotora de ratos Wistar criados em isolamento a partir do desmame somente é detectável após períodos maiores de exposição a um novo ambiente; ii) o padrão de exploração apresentado pelos animais com clara preferência pela periferia da arena pode estar relacionado aos aspectos emocionais da esquizofrenia. Os resultados moleculares fornecem evidências para a participação dos transportadores de glutamato na redução da neurotransmissão glutamatérgica no CPF de ratos criados em isolamento a partir do desmame. Estas evidências podem contribuir para considerar a esquizofrenia uma síndrome de "hipofrontalidade" e para considerar os transportadores de glutamato um futuro alvo terapêutico no tratamento desta patologia.
Apoio Financeiro: FAPESP, Capes e FPA.

Palavras-chave: Isolamento social. Esquizofrenia. Campo aberto. Atividade Locomotora. Imunoistoquímica. EAAC1. GLT1. Córtex pré-frontal. Córtex entorrinal.

ABSTRACT

Bosaipo, N. B. (2012). Pattern of locomotor activity and expression of EAAC1 and GLT1 in prefrontal and entorhinal cortex of rats reared in isolation from weaning. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Isolation rearing of rats from weaning has been used as an experimental model of psychiatric disorders like schizophrenia. It has been demonstrated that isolation induces morphological, behavioral (like hyperactivity in a novel environment) and neurochemical changes similar to those reported for humans with schizophrenia. Evidence suggest that glutamatergic synapses might be the site of primary abnormalities in this disorder with the dopaminergic changes being secundary to the glutamatergic ones. In this context, changes on the mechanisms of regulation of the glutamatergic neurotransmission through glutamate transporters may contribute to the development and/or maintenance of schizophrenia. In this study we analyzed the pattern of locomotor activity and the expression of glutamate transporters (EAAC1 and GLT1) in prefrontal cortex and entorhinal cortex of rats reared in social isolation from weaning. Male Wistar rats (PND 21) were randomly allocated in 2 groups (n=11-12): control (grouped, 3 animals/cage) or isolated (1 animal/cage) for 10 weeks. The animals were tested in the open field (arena) for 20min. and recorded: number of crossings (horizontal exploration), number of rearings (vertical exploration) and time spent either at the center or at the periphery of the arena. The groups were compared using ANOVA or Sudent's "*t*" test (significance level was set at $p \leq 0.05$). The animals were anesthetized (urethane-Sigma, 25%, 5ml/kg), perfused and the brains removed, frozen and further used on the experiments of immunohistochemistry. Sections (40µm) of the prefrontal córtex (PFC) and entorhinal córtex (EC) were used for studying the expression of EAAC1 and GLT1. Isolation rearing induced hyperactivity, with an increase in the number of crossings related to grouped animals ($F_{1,22}$=0,38; p<0,05), being more consistent at the periphery of the arena and after 5 minutes of test ($F_{1,22}$=14,08; p<0,001). In contrast, isolation induced a decrease in the total number of rearings ($F_{1,22}$=0,27; p=0,05), mainly in the center of the arena (58%, $F_{1,22}$=12,48; p<0,01), in the first 15 minutes of test and significant on the 1st and 3rd blocks of time (BT1 e BT3). In the periphery isolation induced a significant increase in the number of rearings in BT2 and BT3. The time spent in both center and periphery of the arena by the rats reared in isolation was, respectively, decreased (54%; $F_{1,22=}$11,11; p<0,01) and increased (65%; $F_{1,22}$=11,20; p<0,01) when compared to grouped rats. The expression of EAAC1 was significantly increased by isolation in PFC (38%, t = 2,730, p = 0,017). In contrast, no change was found in EC (t = 1,892, p = 0,081). Isolation rearing did not induce alterations in the number of immunopositive cells for GLT1 in PFC (t= -1,28; p = 0,21). However, fluorescent labeling of GLT1 was seen associated to both glial cells and neuronal cells. The behavioral results suggest: i) the locomotor hyperactivity of Wistar rats reared in isolation from weaning is only detectable after long periods of exposure to

a novel environment; ii) the pattern of exploration showed by the animals with clear preference for the periphery of the arena might be related to the emotional aspects of schizophrenia. The molecular results provide evidence for the involvement of glutamate transporters on the reduction of glutamatergic neurotransmission in PFC of rats reared in isolation from weaning. This evidence may contribute for considering the schizophrenia a syndrome of "hypofrontality" and for considering the glutamate transporters a future therapeutic target for the treatment of this pathology.
Financial Support: FAPESP, Capes, and FPA.

Keywords: Isolation rearing. Schizophrenia. Open field. Locomotor activity. Immunohistochemistry. EAAC1. GLT1. Prefrontal cortex. Entorhinal cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da placa de acrílico utilizada no experimento de fluorescência.....44

Figura 2: Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade locomotora no centro e na periferia da arena 59

Figura 3: Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade exploratória no centro e na periferia da arena.....51

Figura 4: Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre o tempo de permanência no centro e na periferia da arena.....53

Figura 5: Imunoistoquímica para os transportadores de glutamato EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame.....55

Figura 6: Imunoistoquímica para os transportadores de glutamato EAAC1 no córtex entorrinal (CE) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame.....56

Figura 7: Secções do córtex pré-frontal e do córtex entorrinal incubadas na ausência do Anticorpo primário anti-EAAC1.....56

Figura 8: Número de células imunopositivas para EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) e córtex entorrinal (CE) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame.....57

Figura 9: Imunoistoquímica para os transportadores de glutamato (GLT1) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame.....59

Figura 10: Secções do córtex pré-frontal incubadas na ausência do Anticorpo primário anti-GLT1.....59

Figura 11: Número de células imunopositivas para GLT1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame.....60

Figura 12: Fluorescência para os transportadores de glutamato (GLT1), células gliais (GFAP) e núcleos celulares (DAPI) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos do grupo controle (agrupado) ou isolado a partir do desmame.....62

Figura 13: Fluorescência para os transportadores de glutamato (GLT1), células gliais (GFAP) e núcleos celulares (DAPI) no córtex entorrinal (CE) de ratos do grupo controle (agrupado) ou isolado a partir do desmame.....63

Figura 14: Fluorescência para os transportadores de glutamato (GLT1), citoesqueleto (Faloidina) e núcleos celulares (DAPI) no córtex pré-frontal (CE) de ratos do grupo controle (agrupado) ou isolado a partir do desmame.....64

Figura 15: Fluorescência para os transportadores de glutamato (GLT1), citoesqueleto (Faloidina) e núcleos celulares (DAPI) no córtex entorrinal (CE) de ratos do grupo controle (agrupado) ou isolado a partir do desmame.....65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 Considerações Iniciais 19
1.2 Esquizofrenia 20
1.3 Modelos Animais 22
1.3.1 Isolamento social em ratos 24
1.4 O Papel do Glutamato 26
1.4.1 Mediação glutamatérgica 26
1.4.2 Glutamato e esquizofrenia 29
1.4.3 Transportadores de glutamato 32

2 OBJETIVOS 35

3 MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.1 Animais 38
3.2 Procedimentos Experimentais 38
3.2.1 Estresse por isolamento social 38
3.2.2 Teste de atividade exploratória em ambiente novo (campo aberto ou arena) 39
3.2.3 Perfusão e retirada dos encéfalos 39
3.2.4 Seccionamento dos encéfalos 40
3.2.5 Imunoistoquímica 41
3.2.6 Fluorescência 42

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

5 RESULTADOS 47
5.1 Campo Aberto (Arena) 48
5.1.1 Padrão de atividade locomotora em ratos criados em isolamento a partir do desmame 48
5.1.2 Padrão de atividade exploratória em ratos criados em isolamento a partir do desmame 50

5.1.3 Tempo de permanência no centro e na periferia da arena em ratos criados em isolamento a partir do desmame 52
5.2 Imunoistoquímica 54
5.2.1 Expressão de EAAC1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame 54
5.2.2 Expressão de GLT1 no córtex pré-frontal de ratos criados em isolamento a partir do desmame 58
5.3 Fluorescência 61
5.3.1 Expressão de GLT1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame 61

6 DISCUSSÃO 66
6.1 Atividade locomotora e exploratória em ambiente novo de ratos criados em isolamento a partir do desmame. 67
6.2 Expressão de EAAC1 e GLT1..... 71

7 CONCLUSÃO..... 78

REFERÊNCIAS 81

APÊNDICE 97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

Os transtornos mentais são doenças que afetam a cognição, a emoção e o comportamento. Com início precoce, tendem a se estender cronicamente e a assumir um perfil recorrente. Interferem substancialmente com a capacidade de aprendizado de crianças e com a habilidade de adultos de se relacionar familiar, social e profissionalmente (Hyman, Chisholm, Kessler, Patel, & Whiteford, 2006). As doenças psiquiátricas são comuns em todo o mundo e afetam igualmente pessoas de todas as regiões, países e sociedades (OMS – Organização Mundial de Saúde, 2001). Uma análise da prevalência mundial revelou que 10% da população mundial sofre com alguma doença mental (OMS, 2001). Esse panorama revela a necessidade de se desenvolver medidas preventivas e intervenções terapêuticas para os transtornos psiquiátricos, sendo fundamental a compreensão da neurobiologia destes.

Sabe-se que os transtornos mentais resultam de múltiplos fatores, entre eles os genéticos e os ambientais. No entanto, esclarecer as diversas e complexas etiologias para esses transtornos tem sido um desafio para a neurociência (Hyman, 2008).

Dentre os transtornos psiquiátricos, a esquizofrenia talvez figure como uma das doenças mais intrigantes e também devastadoras da história da humanidade. As estimativas de prevalência na população mundial variam de 0,2 a 2% (APA - Associação Psiquiátrica Americana, 2000). Além dessa parcela, 2 a 3% das pessoas em geral apresentam transtorno de personalidade esquizotípico, que é considerado uma forma mais branda da doença, uma vez que os pacientes não manifestam comportamento psicótico (Kandel, Schwartz & Jessell, 2000; OMS, 1997).

Várias razões justificam o estudo da esquizofrenia, dentre elas: i) a alta prevalência dessa doença, que torna necessário desenvolver tratamentos mais eficazes evitando que os indivíduos sejam condenados à deterioração progressiva e à institucionalização permanente; ii) o elevado custo financeiro para os cuidados de uma pessoa doente, incluindo gastos diretos com internações em uma instituição especializada e indiretos

provocados pela perda da produtividade. Esses custos impõem uma grande carga pública e pessoal e poderiam ser reduzidos com alternativas de tratamento mais eficazes (Holmes, 2001).

1.2 Esquizofrenia

Com origem no grego antigo, a palavra esquizofrenia (σχιζοφρενία) significa "dividir" (σχίζειν, “*schizein*”) “o que diz respeito às coisas do coração, da alma” (φρήν, "*phren*" ou "*phrenés*”) (Rocha, 2001). A raiz etmológica do termo remete assim à cisão do indivíduo, à desordem. A esquizofrenia apresenta manifestações psíquicas, que se caracterizam por uma ampla desorganização dos processos mentais. O traço essencial desta desorganização é a mistura de sinais e sintomas na área do pensamento, percepção e emoções, causando marcados prejuízos nas relações familiares, sociais e profissionais. Nesse quadro a pessoa perde o sentido de realidade ficando incapaz de distinguir a experiência real da imaginária. A esquizofrenia se manifesta em crises agudas com sintomatologia intensa, intercaladas com períodos de remissão quando há um abrandamento dos múltiplos sintomas (APA, 2000). A doença tem sido analisada dentro de um modelo multidimensional que engloba sintomas positivos e negativos, prejuízos cognitivos e sintomas afetivos (Andreasen, 1982, Ho & Andreasen, 2001; Läge, Egli, Riedel, Strauss & Möller, 2011). Os sintomas positivos parecem refletir um excesso ou distorção de funções normais como alucinações, delírios e distúrbios de pensamento, agitação motora e desorganização da fala e do comportamento. Já os sintomas negativos estão relacionados à diminuição ou perda das funções normais, como embotamento afetivo, restrições na fluência verbal e de raciocínio, anedonia (inabilidade em experimentar prazer), retraimento social, diminuição da motivação, iniciativa, entre outros. O prejuízo cognitivo engloba disfunções na memória, atenção, habilidades e nas funções executivas. Os sintomas afetivos englobam depressão, disforia, ideação suicida e afeto inapropriado (Ho & Andreasen, 2001).

Nos últimos 40 anos, os estudos sobre os distúrbios psiquiátricos voltados para os sistemas cerebrais monoaminérgicos contribuíram significativamente para a compreensão da patofisiologia destas doenças (Coppen, 1967; Cowen, 1990, Berton & Nestler, 2006). Desde a metade do século XX várias teorias surgiram a respeito das bases neurobiológicas da esquizofrenia e inúmeros neurotransmissores foram propostos terem efeito direto na atividade neuronial. Dentre as teorias, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia foi a que apresentou argumentos mais consistentes e serviu de estímulo para pesquisas posteriores. Esta hipótese se baseava inicialmente na capacidade da anfetamina e de agonistas dopaminérgicos induzirem sintomas psicóticos semelhantes aos observados na esquizofrenia (Angrist, Lee, & Gershon, 1974; Baker, 1989; Griffith, Cavanaugh, Held & Oates, 1973). A hipótese foi reforçada pelas descobertas de que quase todas as drogas antipsicóticas disponíveis na época eram antagonistas de receptores de dopamina do tipo D2 (Reynolds & Harte, 2007). A teoria dopaminérgica da esquizofrenia sofreu modificações quando observaram elevada densidade de receptores D2 em cérebros de pacientes portadores da doença, sendo então esta característica relacionada aos sintomas positivos da esquizofrenia. Entretanto, sabe-se atualmente que o aumento desses receptores é consequência do tratamento farmacológico da doença e não do processo patológico propriamente (Reynolds & Harte, 2007). A disfunção dopaminérgica continua sendo o alvo terapêutico para o tratamento da esquizofrenia, embora evidências sugiram que esta neurotransmissão não seja o foco primário de disfunção na doença (Carlsson & Carlsson, 1990; Aghajanian & Marek, 2000).

Estudos familiares de gêmeos e de adoção mostram claramente que a etiologia da esquizofrenia é primariamente genética (Harrison & Weinberger, 2005; Harrison, 2007). As chances de um indivíduo desenvolver a patologia são de 12% se um de seus pais for esquizofrênico e sobem para 40% se ambos tiverem a doença. Por outro lado, 81% dos indivíduos que são diagnosticados com esquizofrenia não possuem nenhum familiar em primeiro grau afetado e 91% não têm nenhum parente esquizofrênico (Gottesman, 1991). Assim, ainda que os fatores genéticos sejam importantes, é preciso reconhecer a contribuição de outros fatores durante o

neurodesenvolvimento na gênese da esquizofrenia. Traumas biológicos como doenças ou estresse durante os períodos de desenvolvimento cerebral podem contribuir para explicar os casos de esquizofrenia não associados à herança genética (Holmes, 2001; Miyamoto et al. 2003).

1.3 Modelos Animais

Um grande conjunto de evidências sugere que a esquizofrenia é uma desordem que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). A utilização de modelos experimentais, principalmente modelos genéticos nos quais genes associados à esquizofrenia são abolidos ("*knocked out*"), reduzidos (*"knocked down"*) ou exacerbados (*"over-expressed"*) fornecem evidências de que tais manipulações produzem alterações significativas durante o neurodesenvolvimento. A fidelidade dos modelos experimentais é bastante discutível devido às limitações que apresentam em relação à patologia propriamente, uma vez que fatores relevantes como o pensamento não são adequadamente reproduzidos em animais (Powell & Miyakawa, 2006). Ainda assim, os modelos experimentais em roedores têm sido amplamente utilizados como ferramentas importantes para o esclarecimento da patofisiologia de doenças psiquiátricas como a esquizofrenia (Cryan & Holmes, 2005; Seeburg, Single, Kuner, Higuchi & Sprenge, 2001; Holmes, Lachowicz & Sibley, 2004). Nesse sentido, os modelos animais auxiliam na identificação de alterações morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais relacionadas às patologias e constituem elementos importantes para a compreensão das doenças propriamente, além de contribuírem para o desenvolvimento de novos tratamentos e para o aprimoramento dos diagnósticos (Hyman, 2001).

Uma grande variedade de modelos experimentais tem sido utilizada para o estudo de doenças psiquiátricas. Dentre eles, a exposição crônica de animais a um estressor em condições rigorosamente determinadas tem sido utilizada como modelo de depressão e esquizofrenia (Kim & Kirkpatrick, 1996; Weiss, Pryce, Jongen-Rêlo, Nanz-Bahr & Feldon, 2004).

Algumas pesquisas buscam elucidar os efeitos do estresse continuado (crônico) sobre o organismo e discutem que um problema em se utilizar estímulos estressantes repetidamente é o fato de que os animais podem se adaptar ao estressor (Willner, 1990). Entretanto, tem sido demonstrado que a exposição de um organismo a um tipo de estressor diariamente durante semanas causa déficits severos na memória relacionada ao hipocampo (Sandi, 2004). Além disso, animais estressados cronicamente mostram alterações do comportamento motivado pelo medo (Conrad, LeDoux, Magarinos & Mcewen, 1999). Pittenger & Duman (2008) relacionaram ainda os efeitos do estresse à plasticidade do hipocampo, córtex pré frontal, amígdala e estriado ventral. Neste contexto, Kloet, Joëls, & Holsboer (2005) demonstraram correlações anatômicas e neuroquímicas dos déficits comportamentais induzidos por estresse crônico no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, como a remodelação estrutural e proliferação celular, modificações nos sistemas aminérgicos, de neuropeptídeos e corticosteróides. Estes autores sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica seja primordialmente responsável por mediar as alterações neuroniais que ocorrem como consequência destas exposições.

Considerando as alterações comportamentais, foram identificados alguns comportamentos em ratos relacionados aos sinais e sintomas da esquizofrenia. A agitação psicomotora, observável como hiperatividade locomotora, e a sensibilidade a drogas psicomiméticas, poderiam ser categorizados como sintomas positivos. Entre os sintomas negativos podemos evidenciar a retirada social, mensurável como uma redução da interação com animais da mesma espécie. No contexto cognitivo, os fatores identificados foram a diminuição da memória de trabalho, déficits de atenção, alterações no registro sensório-motor e em funções executivas, além de déficits cognitivos genéricos (Powell & Miyakawa, 2006).

1.3.1 Isolamento social em ratos

O modelo experimental não farmacológico mais utilizado para o estudo da esquizofrenia é o isolamento social de ratos iniciado a partir do desmame e mantido durante todo o período do desenvolvimento cerebral (Fone & Porkess, 2008; Weiss et al. 2004). O isolamento social é considerado um estressor afetivo crônico (Kraeuchi, Gentsch & Feer, 1981; Blanchard, Mckittrick & Blanchard, 2001) e induz alterações semelhantes àquelas que ocorrem no cérebro de humanos esquizofrênicos. Esta similaridade é observada em alterações morfológicas, comportamentais e neuroquímicas, como hiperatividade em um novo ambiente (Sahakian, Robbins & Iversen, 1977), dificuldade de aprendizado discriminativo (Jones, Marsden & Robbins 1991), redução da inibição pelo prepulso – PPI (Geyer, Wilkinson, Humby & Robbins, 1993; Rosa et al., 2005), atrofia dendrítica no estriado (Comery, Shah & Greenough, 1995), funções dopaminérgica e serotoninérgica aumentadas na área mesolímbica (Jones, Hernandez, Kendall, Marsden & Robbins, 1992; Bardgett, Jackson, Taylor & Csernansky, 1998; Hall et al., 1998), déficits na memória de reconhecimento (Bianchi et al. 2006), entre outras alterações que mostram similaridade aos aspectos clínicos da esquizofrenia (Braff et al., 1978).

Animais criados em isolamento apresentam alterações comportamentais e fisiológicas semelhantes a esta neuropatologia quando comparados aos animais criados em grupo (Fone & Porkess, 2008). Segundo Hatch, Balazs, Wiberg & Grice (1963), ratos isolados por um longo período tornam-se emocionalmente mais reativos e agressivos, além de apresentar uma endocrinopatia com hiperfunção do córtex da glândula adrenal. As observações de Weiss et al. (2004) corroboram esses dados e sugerem que o isolamento social crônico aumenta a reatividade ao estresse e produz um hiperfuncionamento do eixo HPA em ratos adultos.

Fone e Porkess (2008), em artigo de revisão, sumarizaram os efeitos induzidos pela criação de ratos em isolamento. Estes incluíram alterações em diversos domínios como peso corporal, comportamento exploratório, inibição pelo pré-pulso do sobressalto acústico, inibição latente, anedonia,

interação social, dor, esquiva passiva, déficits cognitivos, ansiedade, depressão.

Para muitos autores a hiperatividade em ambiente novo é uma das observações mais clássicas e robustas reportadas em ratos criados em isolamento a partir do desmame (Fone & Porkess, 2008; Domeney & Feldon, 1998). Este fenômeno é observado como atividade motora exacerbada (ambulação horizontal e levantamentos) quando animais isolados são comparados a animais criados em grupo. Entretanto, resultados discrepantes foram descritos por alguns autores (Rosa et.al., 2005), os quais não observaram este padrão de comportamento em ratos criados em isolamento durante dez semanas a partir do desmame, quando avaliados na arena durante 5 minutos. Estes achados foram fidedignamente reproduzidos utilizando outros grupos de animais e outros experimentadores do mesmo grupo de pesquisadores (resultados não publicados). A discordância destes resultados em relação aos descritos na vasta literatura relacionada é intrigante, especialmente considerando a hiperatividade neste modelo experimental de isolamento social. Os resultados de Rosa e cols. (2005) foram discutidos por Fone & Porkess (2008), os quais sugeriram que a hiperatividade poderia ter sido observada se os animais fossem mantidos no campo aberto por período superior a 5 minutos.

Assim, outra análise comportamental foi realizada no campo aberto durante 15 minutos, após o mesmo protocolo de isolamento social. Novamente os animais controles (agrupados) e isolados apresentaram igual perfil de atividade exploratória e nenhuma diferença foi observada no decorrer da sessão de teste quando comparações pontuais (minuto a minuto) foram realizadas entre os 2 grupos (artigo em preparação). Posteriormente, estudo semelhante avaliou, separadamente, a atividade exploratória no centro e na periferia da arena. Os resultados foram surpreendentes, uma vez que o perfil de exploração observado demonstrou um padrão mais ativo nos animais isolados contrapondo um padrão mais homogêneo nos animais agrupados. As atividades exploratórias, no centro e na periferia da arena, analisadas em cada minuto reforçou esta característica, uma vez que os animais isolados apresentaram um

comportamento de “vai e vem” entre as 2 áreas da arena, enquanto os animais agrupados exploraram uma ou outra área.

Diante do conjunto de evidências apresentado, a proposta comportamental deste trabalho foi investigar a hipótese de que ratos Wistar isolados durante todo o período do desenvolvimento cerebral apresentam hiperatividade no campo aberto quando testados por tempo mais longo. Adicionalmente, também investigar o padrão desta hiperatividade, se ocorre de forma diferencial na área central ou periférica da arena.

1.4 O Papel do Glutamato

Embora a maioria dos estudos abordando distúrbios psiquiátricos nos últimos 40 anos tenha tido como foco os sistemas cerebrais monoaminérgicos, os quais tem contribuído significativamente para a compreensão da patofisiologia destes distúrbios (Coppen, 1967; Cowen, 1990, Berton & Nestler, 2006), nos últimos anos tem sido reconhecida a participação de outros sistemas neurotransmissores, como o glutamatérgico. Disfunções deste sistema têm sido observadas em uma série de distúrbios mentais (Nieoullon, Canolle, Masmejean, Guillet, Pisano, Lortet, et al., 2006). Nesse sentido, o aprimoramento dos conhecimentos básicos a respeito das sinápses glutamatérgicas poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento direcionadas para reduzir as alterações patológicas associadas com as disfunções desta mediação.

1.4.1 Mediação glutamatérgica

O glutamato é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do SNC. Está presente em aproximadamente 30-40% das sinapses cerebrais e em 80-90% das áreas envolvidas em processos cognitivos como o córtex cerebral e o hipocampo. O glutamato participa de

importantes funções fisiológicas desde o desenvolvimento cerebral, onde está envolvido no processo de migração e diferenciação neuronal, gênese axonal e sobrevivência de neurônios (Bortolotto, Fitzjohn & Collingridge, 1999; Danbolt, 2001).

O glutamato é liberado a partir de neurônios pré-sinápticos e exerce seu efeito através da interação com diferentes tipos de receptores, os quais são divididos em dois grandes grupos, os receptores metabotrópicos (mGluRs) e os ionotrópicos (iGluRs). Os receptores metabotrópicos foram primeiramente descritos por Sadezek et al. (1985) e até o momento foram identificados oito subtipos (mGluR1 a 8). Estes receptores são acoplados a proteínas G e participam dos mecanismos de resposta intracelulares através da ativação de segundos mensageiros (Kubo & Ito, 2004). São divididos em três grupos: grupo I (mGluR1 e 5), grupo II (mGluR2 e 3) e grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8). Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com seus agonistas em N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiônico (AMPA) e cainato (KA). São proteínas transmembrana constituídas por um complexo de diferentes subunidades, em diferentes combinações, que conferem ao receptor maior ou menor permeabilidade ao influxo de íons (Hollmann and Heinemann, 1994).

Sete diferentes subunidades proteicas podem se combinar para formar os receptores NMDA: NR1, NR2A-D e NR3A e B. A subunidade NR1 é codificada por um único gene, que através do processamento alternativo ("*splicing*") dá origem a 8 diferentes subunidades proteicas. Em contraste, cada uma das subunidades NR2 e NR3 são codificadas por genes distintos. Todas as subunidades que compõem os receptores NMDA são permeáveis ao íon Ca^{2+}. Os receptores AMPA são constituídos pela combinação de quatro subunidades diferentes conhecidas como GluR1-4 ou GluRA-D, derivadas de um único gene (Hollman & Heinemann, 1999). Essas subunidades possuem diferentes permeabilidades ao íon $Ca^{2+,}$ sendo a subunidade GluR2 completamente impermeável. O processamento alternativo dos genes que codificam as subunidades AMPA dá origem a duas isoformas distintas destas proteínas, flip e flop, que conferem aos receptores diferentes propriedades físicas e químicas (Sommer et al., 1990). Os receptores de KA são também formados pela combinação de 5

subunidades diferentes, GluR5-7 (de baixa afinidade) e KA1 e 2 (de alta afinidade), todos codificados por genes distintos (Rosa, 2006). Entretanto, concentrações excessivas de glutamato resultam na superestimulação de seus receptores ionotrópicos levando ao aumento do influxo de Ca^{2+} para dentro dos neurônios e ativando um mecanismo intracelular conhecido como excitotoxicidade. Através de AMPA, NMDA ou cainato, a superestimulação por glutamato é seguida por rápida elevação das espécies de oxigênios reativos (ROS) resultando em morte neuronal pela ativação dos mecanismos de estresse oxidativo (Deutsch, Rosse, Schwartz, Mastropaolo, 2001).

Considerando a relação entre a mediação glutamatérgica e o estresse, esta mediação demonstrou estar intimamente envolvida com o estresse e a neurotoxicidade cerebral (Sapolski, 2000). Mais recentemente tem sido apontada a relevância de seu papel na patofisiologia de doenças mentais (Hashimoto, 2009; Almeida et al., 2010; Banasr et al., 2010). Evidências apontam que tanto o estresse agudo quanto o crônico aumentam as concentrações extracelulares de glutamato (Lowy, Wittenberg & Yamamoto, 1995; Moghaddam, Bolinao, Stein-Behrens & Sapolski, 1994). Chou, Lin e Sapolsky (1994) observaram que uma superestimulação do sistema glutamatérgico por uma resposta neurotóxica ao estresse foi capaz de provocar modificações no hipocampo e no córtex pré-frontal de pacientes com transtornos mentais. Além disso, Rosa et al. (2002) sugeriram que modificações na expressão de receptores de glutamato no hipocampo e córtex entorrinal induzidas pela exposição crônica ao estresse podem participar dos mecanismos que levam ao aumento da excitabilidade e vulnerabilidade dos neurônios da formação hipocampal em resposta ao estresse severo e recorrente. Adicionalmente, Sunanda e Raju (1997) demonstraram que o córtex entorrinal pode atuar como um modulador da lesão hipocampal resultante deste tipo de estresse, uma vez que a lesão do córtex entorrinal foi capaz de reduzir a atrofia da área CA3 induzida por estresse de restrição crônico ou pela administração crônica de corticosteróides.

1.4.2 Glutamato e esquizofrenia

Considerando a participação do glutamato nos mecanismos cerebrais envolvidos na esquizofrenia, foi demonstrado que uma redução na mediação glutamatérgica pode contribuir para a disfunção cognitiva que ocorre nesta neuropatologia (Pratt, Winchester, Egerton, Cochran, & Morris, 2008; Nanitos, Nguyen, & Balcar, 2005; Bauer, Haroutunian, Meador-woodruff & Mccullumsmith, 2010). Adicionalmente, tem sido sugerido que as sinapses glutamatérgicas podem ser o sítio das anormalidades primárias que ocorrem nesta doença, com as alterações dopaminérgicas sendo secundárias às alterações glutamatérgicas (Carlsson & Carlsson, 1990). Estudos realizados em cérebros de esquizofrênicos demonstraram que estas anormalidades podem envolver diferentes classes de receptores, NMDA e não-NMDA, e que as alterações mais consistentes ocorrem em estruturas do lobo temporal e medial, mais precisamente na região hipocampal. Foram também demonstradas alterações na neurotransmissão aminérgica clássica em áreas cerebrais que recebem projeções do hipocampo como o complexo amigdalóide, córtex prefrontal e entorrinal e núcleo acumbens (Heidbreder et al., 2000; Lapiz, Mateo, Durkin, Parker & Marsden, 2001). Utilizando o modelo experimental de estresse por isolamento social por 10 semanas a partir do desmame, Sestito et al. (2011) recentemente demonstraram significante redução na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA no hipocampo de ratos. Posteriormente, esses autores também demonstraram que apenas a subunidades flip de GluR1 e GluR2 estavam reduzidas no hipocampo dos animais isolados (artigo em preparação). Estes resultados são altamente coerentes com evidências da literatura reforçando o envolvimento da mediação glutamatérgica na esquizofrenia a partir de estudos experimentais e também de estudos realizados em cérebros de pacientes esquizofrênicos (Reynolds & Harte, 2007; Paz, Tardito, Atzori, & Tseng, 2008; Nanitos, Nguyen, & Balcar, 2005).

Evidências adicionais associando a mediação glutamatérgica à esquizofrenia têm demonstrado que todos os genes mais claramente envolvidos no desenvolvimento da esquizofrenia codificam proteínas que

potencialmente tem um impacto direto ou indireto na função das sinapses glutamatérgicas. Por exemplo, o gene Neuroregulina 1 (NRG1) é bem estabelecido como um marcador eficiente para o neurodesenvolvimento e tem sido amplamente utilizado nestes estudos (Mei & Xiong, 2008; Kwon, Longart, Vullhorst, Hoffman & Buonanno, 2005). Várias isoformas de NRG1 parecem estar associadas a diferentes processos envolvidos no neurodesenvolvimento, como migração e proliferação celular, crescimento axonal, mielinização, entre outros. Tem sido demonstrado que este gene está fortemente associado à suscetibilidade ao desenvolvimento da esquizofrenia (Harrison & Law, 2006), ao prejuízo cognitivo e à mediação destes processos durante a adolescência e na idade de adultos jovens (Hall, Whalley, Job, Baig, McIntosh, Evans, Thomson, et al., 2006).

Além de genes específicos, inúmeras proteínas têm sido associadas ao desenvolvimento das neuropatologias como a esquizofrenia. Eastwood e Harrison (1995) demonstraram reduzida expressão de sinaptofisina em algumas áreas do hipocampo de pacientes esquizofrênicos. A sinaptofisina é uma proteína específica da sinapse, localizada no terminal pré-sináptico e importante no processo de liberação do neurotransmissor (Wiedenmann & Franke, 1985). Reduções na expressão de sinaptofisina sugerem conteúdo sináptico também reduzido, embora não permita qualquer diferenciação entre tipos de sinapse ou identificação do neurotransmissor (Masliah, Terry, Alford & DeTeresa, 1990). Posteriormente, em um estudo experimental foi demonstrada uma redução na expressão de sinaptofisina no hipocampo, principalmente no giro denteado, de ratos criados em isolamento durante todo período do desenvolvimento cerebral a partir do desmame (Varty, Marsden & Higgins, 1999), sugerindo uma perda da densidade sináptica hipocampal nestes animais.

Evidências experimentais obtidas a partir de estudos realizados em cérebros *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos mostraram uma redução na mediação glutamatérgica em várias regiões cerebrais nesta patologia e sugerem que esta redução pode contribuir para a disfunção cognitiva observada na esquizofrenia. Estes resultados podem ser associados à demonstração de que especificamente as subunidades GluR1 dos receptores AMPA possuem um papel crítico na mediação da plasticidade

sináptica e na cognição (Malenka, 2003; Malinow & Malenka, 2002). Com o objetivo de associar a perda da densidade sináptica hipocampal, a disfunção cognitiva e especificamente a mediação glutamatérgica, Eastwood et al. (1995) demonstraram também uma redução na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 no hipocampo de pacientes esquizofrênicos. Posteriormente, este grupo de pesquisadores demonstrou que ratos tratados cronicamente com o antipsicótico haloperidol apresentavam alterações na expressão de receptores de glutamato no SNC, sugerindo que as drogas antipsicóticas têm efeitos potencialmente importantes na mediação glutamatérgica (Eastwood, Heffernan & Harrison, 1997). Mais recentemente, Wiedholz et al. (2008) demonstraram que camundongos geneticamente modificados com ausência da subunidade GluR1 dos receptores AMPA apresentam alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à esquizofrenia, tais como hiperatividade em um novo ambiente, déficit de atenção e hiperdopaminergia no estriado. Adicionalmente, os autores demonstraram que estas alterações foram revertidas pelo tratamento com antagonistas dopaminérgicos como o haloperidol.

As evidências descritas na literatura permitem estabelecer uma relação clara entre disfunções nas neurotransmissões glutamatérgica e dopaminérgica tanto na esquizofrenia em humanos como nos modelos experimentais desta neuropatologia. Considerando especificamente as disfunções na mediação glutamatérgica, é possível que haja uma contribuição dos mecanismos responsáveis pelo término de ação deste neurotransmissor liberado na fenda sináptica, ou seja, a retirada do glutamato pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) (Eatwood & Harrison, 2005; Liguz-Lecznar & Skangiel-Kramska, 2007). Neste contexto, alterações nestes mecanismos, sejam no aspecto funcional e/ou na expressão das proteínas transportadoras, terão como consequência alterações na modulação de ação do neurotransmissor nos receptores sinápticos e podem contribuir para o conjunto das alterações glutamatérgicas envolvidas nas doenças psiquiátricas (Bauer et al. 2010, Karlsson, Heilig & Holmes, 2008).

1.4.3 Transportadores de glutamato

Existem duas famílias de transportadores de glutamato que diferem quanto às suas características funcionais: Os transportadores do tipo vesiculares (VGLUTs), os quais atuam no armazenamento do glutamato nas vesículas sinápticas; e os transportadores de aminoáciodos excitatórios (EAATs), localizados na membrana plasmática de astrócitos (EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT1) e neurônios (EAAT3/EAAC1), os quais realizam a recaptação do glutamato liberado na fenda sináptica como um mecanismo de término de ação do neurotransmissor (Benarroch, 2010; Danbolt, 2001).

Os EAATs são proteínas transmembrana com peso molecular de aproximadamente 64 kDa e possuem mais de uma subunidade (Yang & Kilberg, 2002). Tem sido demonstrado que os EAATs são provavelmente trímeros, com 8-10 domínios transmembrana e possuem as extremidades C-terminal e N-terminal localizadas intracelularmente (Haugeto et al., 1996; Grunewald, Menaker & Kanner, 2002).

Os EAATs contribuem para uma rápida remoção do glutamato liberado no meio extracelular. Embora as células da glia, especialmente os astrócitos circundantes, possuam um papel chave na recaptação do glutamato, os neurônios também contribuem para este mecanismo (Danbolt, 2001). Nos astrócitos o glutamato é convertido em glutamina, a qual é transportada de volta ao neurônio pré-sináptico e utilizada na síntese de um novo neurotransmissor (Danbolt, 2001). Tem sido discutido que pelo menos no hipocampo e córtex cerebral a recaptação do glutamato deve ser primariamente neuronial, uma vez que nestas áreas cerebrais um grande número de sinapses não é circundada por astrócitos, como ocorre no córtex cerebelar (Bergles, Diamond & Jahr, 1999).

A importância funcional dos transportadores neuroniais no córtex cerebral e hipocampo não foi claramente compreendida até o momento, mas sua contribuição deve ser essencial na modulação da transmissão excitatória. Foi demonstrado que durante o desenvolvimento cerebral o EAAC1 (neuronal) é expresso anteriormente ao GLAST e GLT1 (gliais),

sugerindo que a contribuição dos diferentes transportadores na recaptação do glutamato está relacionada à presença dos diferentes tipos celulares no decorrer do processo de desenvolvimento (Nieoullon et al., 2006).

Evidências experimentais têm demonstrado que alterações no transporte de glutamato estão envolvidas na patofisiologia de diversas doenças mentais (Maragakis & Rothstein, 2004; Benarroch, 2010). Por exemplo, alterações nos EAATs do tipo EAAC1 têm sido associadas a modelos experimentais de epilepsia (Crino et al., 2002), isquemia (Gottlieb, Domercq & Matute, 2000) e doença de Alzheimer (Masliah et al., 2000). Alternativamente, uma vez que os EAATs do tipo GLT1 em ratos são os principais responsáveis por controlar as concentrações extracelulares de glutamato no SNC, estudos sugerem que drogas capazes de aumentar a expressão de GLT1 pelos astrócitos podem ter um efeito antidepressivo graças à propriedade de diminuir os níveis elevados de glutamato associados à depressão maior. (Reagan et al., 2004; Zink, Vollmayr, Gebicke-Haerter, & Henn, 2010). Há evidências experimentais pioneiras de que o estresse crônico modula a taxa de recaptação do glutamato (Moghaddam, 1993) e prejudica a função glial no córtex pré-frontal provocando modificações nos níveis de glutamato (Banasr et al., 2008, Sanacora et al., 2007). As alterações celulares, metabólicas e comportamentais induzidas pelo estresse crônico podem ser revertidas e/ou bloqueadas por um tratamento crônico com riluzole, que age no sistema glutamatérgico antagonizando receptores do tipo NMDA, resultando em menor liberação de glutamato e maior recaptação desse neurotransmissor. (Sanacora et al., 2007).

Estudos mais recentes têm demonstrado uma relação entre alterações na função dos EAATs e a etiologia da esquizofrenia. Uma hiperatividade dos transportadores de glutamato presentes nos astrócitos que circundam as sinápses excitatórias no córtex pré-frontal foi demonstrada por Nanitsos et al. (2005).

Matute et al. (2005) também demonstraram aumento nos níveis de RNAm que codificam o EAAT glial do tipo GLT1 no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos não tratados, enquanto uma redução foi observada em pacientes tratados com antipsicóticos. Estes resultados

sugerem que o aumento no RNAm, proteína e função de GLT1 pode contribuir para a reduzida eficácia da transmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal de esquizofrênicos. Em contraste com estas observações, recentemente Bauer et al*.,* (2010) demonstraram uma menor glicosilação de ambos os EAATs gliais, mas não do EAAT neuronial, no cérebro de pacientes esquizofrênicos, o que sugere uma redução na recaptação do glutamato. De acordo com estes achados, Ohnuma et al. (1998) demonstraram uma redução na expressão do RNAm que codifica o EAAT2/GLT1 glial no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos.

Adicionalmente aos EAATs, Eastwood e Harrison (2005) também demonstraram uma redução no RNAm que codifica os transportadores vesiculares (VGLUTs) na formação hipocampal e córtex pré-frontal na esquizofrenia.

A participação do glutamato nos mecanismos cerebrais ativados por estresse assim como nas alterações que ocorrem no cérebro de humanos esquizofrênicos não é completamente entendida até o momento. O isolamento social de ratos a partir do desmame e mantido durante todo o período do desenvolvimento cerebral pode ser um modelo experimental adequado para estudos posteriores sobre os vários componentes do sistema glutamatérgico, contribuindo com evidências que permitam integrar as características moleculares, genéticas e neuropatológicas da esquizofrenia (Meador-Woodruff & Healy, 2000; Paz, Tardito, Atzori, & Tseng. 2008). O aprimoramento dos conhecimentos a respeito da patofisiologia desta desordem pode contribuir para o desenvolvimento de novas drogas com melhor eficácia que os medicamentos atualmente disponíveis e também contribuir para modificar o processo da doença propriamente.

Assim, considerando que alterações nos mecanismos de regulação desta neurotransmissão pelos transportadores de glutamato podem estar envolvidas no desenvolvimento da esquizofrenia, é possível que a expressão destas proteínas transportadoras nas células neuronais (EAAC1) e gliais (GLT1) do córtex pré-frontal e entorrinal estejam alteradas em ratos submetidos ao isolamento durante todo o período de desenvolvimento cerebral.

2 OBJETIVOS

Os **objetivos gerais** deste estudo foram:

Avaliar as alterações comportamentais e moleculares induzidas por estresse afetivo (isolamento social) aplicado em ratos durante todo o período do desenvolvimento cerebral (10 semanas a partir do desmame). As avaliações foram feitas ao final do período de isolamento.

Os **objetivos específicos** foram:

1) Avaliar o padrão de atividade locomotora e exploratória durante 20 minutos no campo aberto (arena) de ratos isolados por 10 semanas a partir do desmame. Esta avaliação foi realizada separadamente no centro e na periferia da arena.

2) Analisar a expressão das proteínas transportadoras de glutamato, EAAC1 e GLT1, no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos isolados por 10 semanas a partir do desmame. Esta análise foi realizada por meio do método de imunoistoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 62 ratos da linhagem Wistar machos, com 21 dias de idade (±40g) provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP), *Campus* de Ribeirão Preto. Imediatamente após o desmame os animais foram divididos aleatoriamente e colocados em caixas de polipropileno (medidas 34 x 41 x 17 cm - largura x comprimento x altura) forradas com maravalha, O número de animais por caixa dependeu do grupo experimental a que pertenciam, sendo: ***Agrupados,*** n=12 (3/ caixa) ou ***Isolados,*** n=12 (1/caixa).

Todos os animais (isolados e agrupados) foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão (LNED) da FFCLRP-USP, com livre acesso a água e ração, sob ciclo normal claro/escuro (12h/12h), temperatura constante (23±1ºC) e podendo ver, ouvir e sentir o cheiro dos outros animais.

Todos os procedimentos experimentais utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Campus USP, Ribeirão Preto, sob o protocolo 05.1.769.53.0.

3.2. Procedimentos Experimentais

3.2.1 – Estresse por isolamento social

Os animais do grupo “Isolado” foram colocados individualmente nas caixas, sendo manipulados apenas 1 vez por semana para a limpeza das mesmas. Os animais do grupo “Agrupados” foram colocados em número de 3/caixa, sendo manipulados 3 vezes por semana. Neste procedimento, os animais de ambos os grupos foram suspensos rapidamente pela cauda e transferidos para uma caixa limpa (5 segundos de manipulação) a fim de

evitar que o contato com o manipulador tivesse qualquer interferência nos resultados. Os animais permaneceram nestas condições por 10 semanas.

3.2.2 - Teste de atividade exploratória em ambiente novo (campo aberto ou arena)

Ao término do período de isolamento os animais, agrupados e isolados, foram testados para analisar as alterações da atividade exploratória induzida pela criação em isolamento.

O teste consistiu na exposição individual dos animais a uma arena circular de acrílico transparente (60 cm de diâmetro x 50 cm de altura), colocada sobre um assoalho dividido em 12 quadrantes de mesma área. Os animais foram colocados no centro da arena e seus comportamentos registrados por um equipamento de vídeo para análise e quantificação.

A sessão experimental teve duração de 20 minutos e foram registrados:

- Exploração Horizontal/Atividade Locomotora: Número de cruzamentos (*crossings)* com as 4 patas nos quadrantes da arena;
- Exploração Vertical: Número de levantamentos das patas dianteiras;
- Tempo despendido.

Todas essas variáveis foram avaliadas na região central e na periferia da arena, separadamente. A quantificação foi feita a cada minuto durante os 20 minutos de teste.

3.2.3– Perfusão e retirada dos encáfalos

Após o teste comportamental os animais foram submetidos aos procedimentos de perfusão, retirada dos encéfalos, congelamento e estocagem, de acordo com o protocolo exigido para posterior utilização nos experimentos de imunoistoquímica. Primeiramente os animais foram

profundamente anestesiados com uma injeção intraperitonial de Uretana 25% (0,5ml/100 gramas de peso corporal). Em seguida foi realizada perfusão intracardíaca para a lavagem e a fixação do encéfalo. Este procedimento consistia em fazer uma incisão na região do tórax do animal, expondo seu interior. A seguir, com o auxílio de uma bomba de perfusão, administrou-se solução de PBS 0,1 M (salina tamponada com fosfato - *phosphate-buffered saline*, pH 7,3) pelo ventrículo esquerdo (300ml) e, simultaneamente, fazia-se uma incisão no átrio direito para permitir a saída da solução de salina e a "lavagem" do sangue de todo o tecido perfundido. Ao final dos 300ml de PBS 0,1 M os animais foram perfundidos com 200 ml de solução de parafomaldeído 4% (PFA 4%) em PBS 0,2M com o objetivo de fixar o tecido. Terminada esta etapa os encéfalos foram cuidadosamente retirados da caixa craniana, colocados em frascos contendo a solução de fixação de PFA 4% em PBS 0,2M por 2 horas adicionais e em seguida crioprotegidos em sacarose (concentrações crescentes de 10%, 20% e 30% em PBS 0,1M) por 48 a 72 horas a 4ºC. Após este período os encéfalos foram congelados em isopentana resfriada em gelo seco e mantidos em freezer -70ºC até o seccionamento.

3.2.4 - Seccionamento dos encéfalos

Vinte e quatro horas antes do seccionamento, os encéfalos foram transferidos para o freezer -20ºC. Em seguida foram embebidos em Tissue Tek® e fixados na base apropriada do criostato (Leica), calibrado entre -19 e -21°C. Secções de 40µm foram retiradas ao longo de todo o cérebro e armazenas em tubos "eppendorf" contendo solução anticongelante a -20ºC. Com o auxílio do atlas de Paxinos e Watson (1997) os tubos foram catalogados de acordo com os "plates" correspondentes às secções armazenadas.

Uma vez que o número de animais (n) necessário para estudos moleculares é inferior àquele para estudos comportamentais, foram aleatoriamente selecionados 8 encéfalos dos animais de cada grupo

experimental para serem seccionados e posteriormente utilizados nos experimentos de imunoistoquímica. Os demais permanecem armazenados a -70ºC para serem utilizados em estudos adicionais neste modelo experimental. Esta conduta contribui para evitar o uso desnecessário de novos animais.

3.2.5 - Imunoistoquímica

Os procedimentos de imunoistoquímica foram realizados utilizando o anticorpo anti-EAAC1 (MAB1587, Millipore) e anti-GLT1 (AB1783, Millipore). Foram utilizadas 3 secções adjacentes de cada área de interesse (córtex pré-frontal e córtex entorrinal) de cada animal. As secções foram selecionadas e retiradas dos tubos “eppendorfs” correspondentes de acordo com o catálogo previamente organizado. Estas foram colocadas em placas de acrílico contendo poços, adequadas para a realização do procedimento de imunoistoquímica “free-floating”.

Inicialmente, as secções foram lavadas (4x/5min.) em PBS 0,01 M + *Triton* 0,15% em solução tampão para a retirada da solução anticongelante. Em seguida, os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,6% em solução tampão por 15 min., com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena existente por todo o tecido e impedir a marcação inespecífica e *background*. Os cortes foram lavados (4x/5min.) com solução tampão e incubados por 1hora com soroalbumina bovina (BSA, Sigma - A9647) a 2% em solução tampão. A BSA se liga aos sítios específicos e evita background. As secções foram então lavadas em solução tampão e incubadas *overnight* com o anticorpo primário, mouse anti-EAAC1 (1:1000) ou guinea pig anti-GLT1 (1:2000). No dia seguinte as secções foram lavadas em solução tampão e incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse ou anti-guinea pig) por 90 min., novamente lavadas em tampão e incubadas com o complexo avidina-biotina (ABC, 1:125 em solução tampão) por 1 hora para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotinilada. As secções foram então incubadas em tampão Tris (TB, 0,25M) por 5 min. e,

após nova lavagem, a reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidina (DAB – Sigma) diluída em TBS 0,1M com H_2O_2 (10g DAB: 20ml de TBS 0,1M: 0,3µl H_2O_2), que precipita na cor marrom-caramelo ao se ligar às moléculas de H_2O_2. Como controle da especificidade de ligação, uma secção de cada área foi ensaiada com a omissão do anticorpo primário.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, diafanizadas e cobertas com permount e lamínula. Após a secagem foi feita a análise histológica das secções em microscópio óptico (Axioskop 40:Carl Zeiss - Alemanha) e as regiões do córtex pré-frontal e entorrinal fotografadas utilizando uma câmera conectada ao microscópio (Axiocam ICc3) e a um computador com software de aquisição e análise de imagens (Axiovision Rel. 4.8). As imagens foram posteriormente utilizadas para a quantificação do número de células imunopositivas (IC) para EAAC1 (EAAC1-IC) e GLT1 (GLT1-IC) utilizando o software ImageJ 1.45s (Rasband, W., National Institute of Health – NIH: USA, s/d).

A quantificação das células imunopositivas foi realizada em todo o campo de visão em um aumento de 200x, correspondendo a uma área fixa de 566µm x 424µm (0.24mm^2) para cada região cerebral. Foram quantificadas três secções por animal, bilateralmente (6 valores/região/rato). Foi calculada a média dos 6 valores e os resultados expressos como número de células positivas/0.1mm^2.

3.2.6 – Fluorescência

O procedimento de fluorescência compreendeu tanto reações imunológicas quanto reações histológicas. Foi realizada a dupla marcação das céulas utilizando anticorpos específicos para o transportador GLT1 (guinea pig anti-GLT1, Millipore: AB1783) e para células gliais (mouse anti-GFAP, Sigma: G3893) (imunofluorescência indireta), além da marcação do citoesqueleto por meio da ligação de Faloidina com actina e de núcleos celulares por meio da ligação de DAPI com DNA (histofluorescência).

Para a imunofluorescência indireta, 6 secções de cada área de interesse (córtex pré-frontal e córtex entorrinal), adjacentes às secções utilizadas no experimento de imunoistoquímica anterior, foram acomodadas em placas de acrílico contendo poços para incubações “free-floating”.

Inicialmente as secções foram lavadas (4x/5min.) em PB 0,1 M + Triton X-100 0,15% em PB para a retirada da solução anticongelante e em seguida lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M. De acordo com o método descrito por De Oliveira e Nanci (2004) e De Oliveira *et al*. (2003), as secções foram permeabilizadas em Triton X-100 0,5% em PB durante 10 min. e em seguida novamente lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M.

Para realizar as diferentes marcações, as secções foram divididas em dois conjuntos iguais de 3 secções/animal de ambos os grupos experimentais (veja esquema abaixo). Um conjunto de secções foi incubado com os anticorpos primários guinea pig anti-GLT1 (1:1000) e mouse anti-GFAP (1:1000), enquanto o outro conjunto de secções foi incubado apenas com o anticorpo primário guinea pig anti-GLT1 (1:1000). Após 60min. todas as secções foram lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M. Em seguida, o primeiro conjunto de secções foi incubado com os anticorpos secundários goat anti-guinea pig conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 594 (1:200, Molecular Probes: A11076 - vermelho) e goat anti-mouse conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes: A11001 - verde). O segundo conjunto de secções foi incubado com o anticorpo secundário goat anti-guinea pig conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 594 (1:200, Molecular Probes: A11076 - vermelho) e com o marcador de citoesqueleto Phalloidin conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes: A12379 - verde).

Após 50 min. ao abrigo da luz, todas as secções foram lavadas (3x/5min.) em PB 0,1M e em seguida incubadas por 5 min. com o marcador de núcleos celulares DAPI 0,25µl/ml (4',6-diamino-2phenylindole, dihydrochloride, Molecular Probes: D1306 - azul). As secções foram novamente lavadas em PB 0,1M (2x/5min.) e em água deionizada (1x/5min.) com o objetivo de eliminar os sais e evitar a proliferação de fungos.

As secções foram montadas em lâminas não-gelatinizadas com o auxílio do meio de montagem *anti-fade* e cobertas com lamínula. As

marcações foram analisadas por epifluorescência em microscópio de epifluorescência (Axio Imager) acoplado a uma câmara fotográfica digital (AxionCam MRm). Foi realizada a aquisição das imagens de cada marcação para ambas as áreas cerebrais e grupos experimentais, as quais estão apresentadas individualmente assim como sobrepostas por meio do *software Adobe Photoshop*.

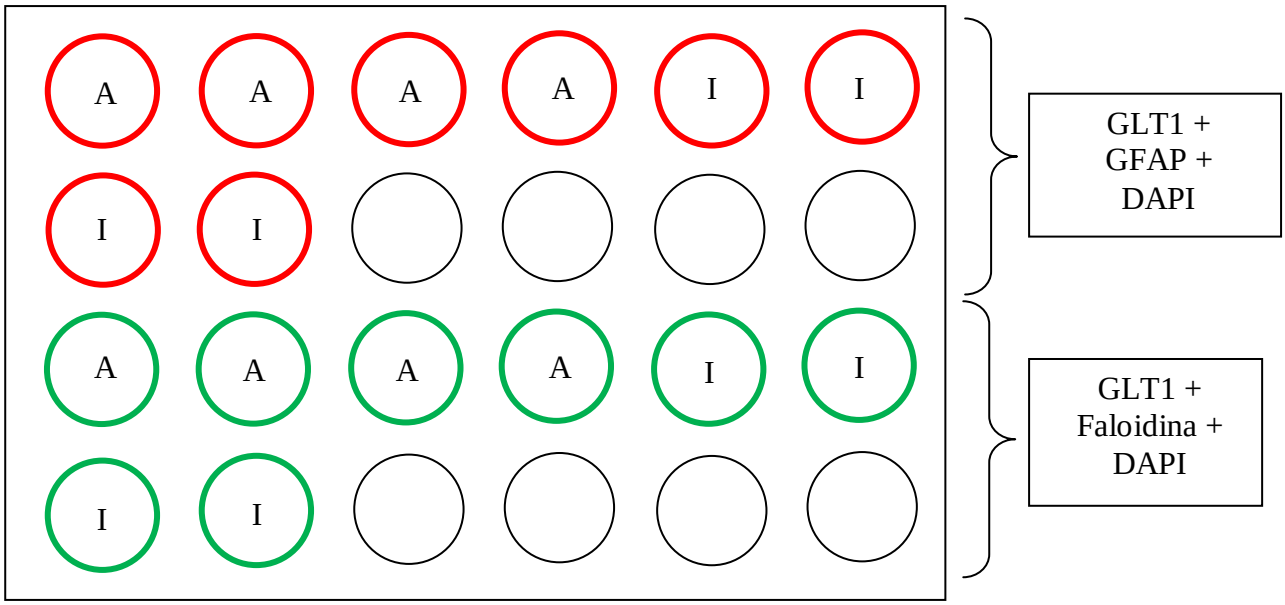

Figura 1: Representação esquemática da placa de acrílico utilizada no experimento de fluorescência. Secções cerebrais do córtex pré-frontal (CPF) e córtex entorrinal (CE) de 4 ratos controle (agrupados – A) e 4 isolados (I) foram distribuídas em dois conjuntos de poços de acordo com os anticorpos e marcadores celulares (vermelho – GFAP e verde – Faloidina). Em cada poço foram incubadas 3 secções adjacentes do CPF e CE de cada animal.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos testes comportamentais para os grupos controle-agrupados e isolados foram comparados através de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA). Os dados obtidos nos experimentos de imunoistoquímica para estes grupos, com detecção por DAB, foram comparados através do teste "*t*" de Student. Foi utilizado o software SPSS (*Statistical Package for Social Studies*) for Windows, versão 16. Foram consideradas diferenças significantes quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Campo Aberto (Arena)

5.1.1- Padrão de atividade locomotora em ratos criados em isolamento a partir do desmame.

A atividade locomotora (exploração horizontal) apresentada pelos grupos isolados e agrupados está representada na figura 2. Pode-se observar que esta atividade foi intensa nos primeiros minutos, seguida de uma redução gradativa até o término da sessão de 20 minutos de teste na arena. Este perfil foi observado tanto no centro como na periferia da arena.

A criação em isolamento induziu um aumento estatisticamente significante da atividade locomotora, representada pelo número total de cruzamentos em 20 minutos de teste ($F_{1,22}$=0,38; $p<0,05$; Fig.2A). Este aumento ocorreu apenas na região periférica (73%; $F_{1,22}$= 14,08; $p<0,001$), enquanto nenhuma diferença foi observada entre os grupos no centro da arena ($F_{1,22}$= 0,13; $p>0,05$; Fig.2A).

Esta característica foi evidenciada quando o número de cruzamentos foi comparado entre os grupos em BTs de 5 minutos (Fig. 2B) e demonstrou que os animais isolados apresentavam aumento estatisticamente significante na atividade locomotora em relação aos agrupados a partir de 5 minutos de teste (BT1: $F_{1,22}$=3,08; $p>0,05$; BT2: $F_{1,22}$=23,53; $p<0,0001$; BT3: $F_{1,22}$=20,29; $p<0,001$; BT4: $F_{1,22}$=5,75; $p<0,05$). A análise do número de cruzamentos, apenas na periferia da arena, em cada minuto durante os 20 minutos de teste permitiu definir o perfil temporal da atividade locomotora (Fig. 2C). Os animais criados em isolamento apresentaram aumento estatisticamente significante do número de cruzamentos no 3° (t=-3,28; $p<0,01$), 5° (t=-3,48; $p<0,01$), 7° (t=-2,21; $p<0,05$), 10° (t=-3,25; $p<0,01$), 11° (t=-4,07; $p<0,001$), 14° (t=-2,08; $p<0,05$), 16° (t=-2,21; $p<0,05$) 18° (t=-4,07; $p<0,001$) minutos quando comparados aos animais criados em grupo.

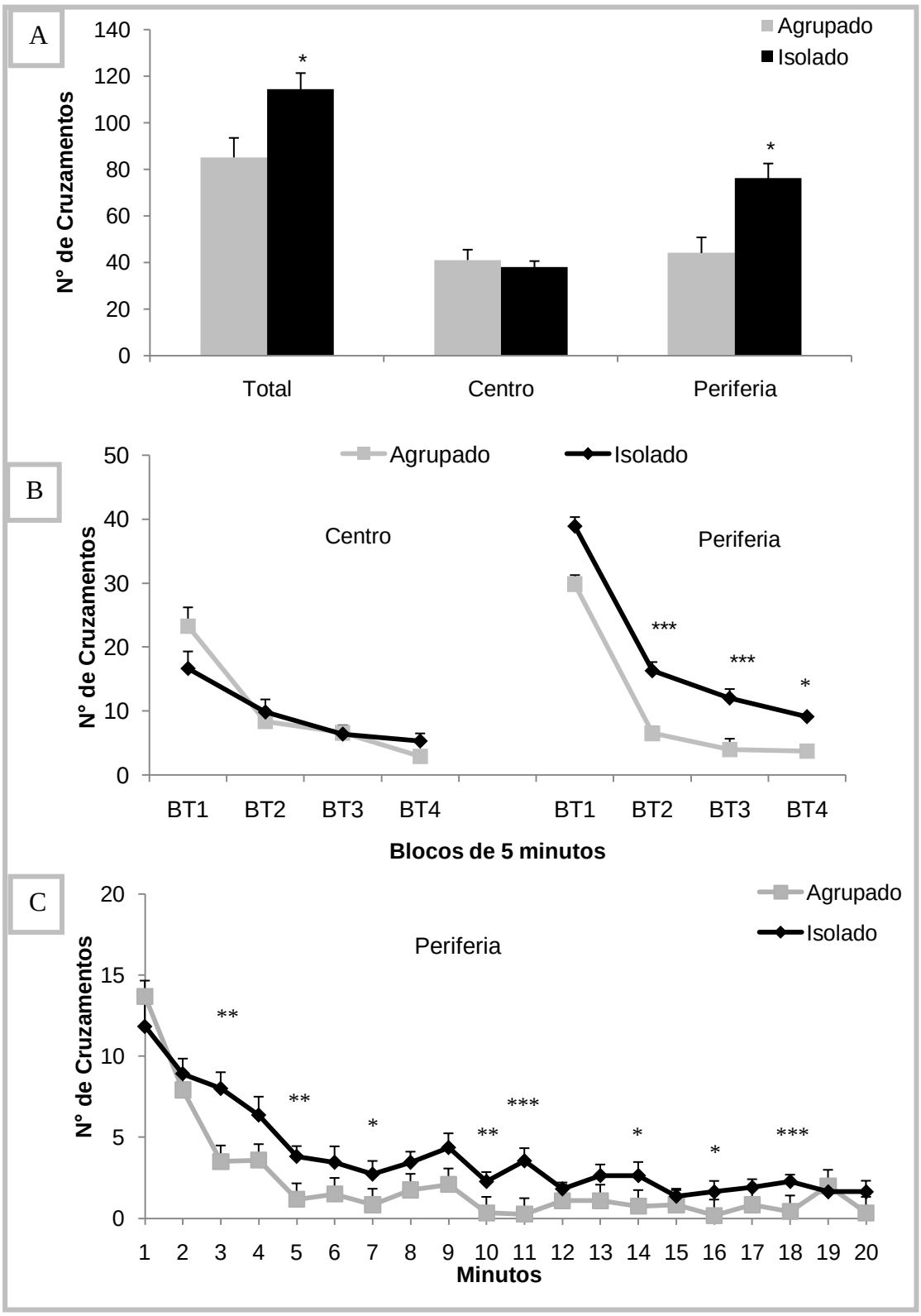

Figura 2 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade locomotora no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias±EPM do número total de cruzamentos durante os 20 minutos de teste: (A) em toda a arena, no centro e na periferia, separadamente; (B) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos no centro e na periferia da arena; (C) em cada minuto na periferia da arena. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001.

5.1.2- Padrão de atividade exploratória em ratos criados em isolamento a partir do desmame.

A figura 3 mostra a atividade exploratória (exploração vertical) apresentada pelos grupos isolado e agrupado durante os 20 minutos na arena. Observa-se que os animais isolados apresentaram uma redução estatisticamente significante na atividade exploratória total no campo aberto em relação aos agrupados, demonstrada pelo número de levantamentos registrados durante os 20 minutos de teste ($F_{1,22}$=0,27; p=0,05; Fig. 3A). Entretanto, quando os grupos foram comparados no centro ou na periferia da arena, separadamente, esta redução foi estatisticamente significante apenas no centro da arena (58%, $F_{1,22}$=12,48; p<0,01; Fig. 3A). A análise em BTs de 5 minutos (Fig. 3B) demonstrou que esta redução no centro ocorreu nos primeiros 15 minutos de teste, quando o número de levantamentos apresentado pelos animais isolados foi menor que aquele apresentado pelos animais agrupados no BT1 ($F_{1,22}$=14,95; p<0,001) e BT3 ($F_{1,22}$= 7,54; p<0,05). Em contraste, na periferia da arena os animais isolados apresentaram um aumento estatisticamente significante no número de levantamentos no BT2 ($F_{1,22}$= 4,92; p<0,05) e BT3 ($F_{1,22}$= 6,83, p<0,05). Uma análise do perfil temporal da atividade exploratória apenas no centro da arena está apresentada na figura 3C, onde a comparação entre os grupos em cada minuto dos 20 minutos de teste demonstrou que a redução no número de levantamentos apresentada pelos animais isolados em relação aos agrupados foi estatisticamente significante no 1° (t=3,22, p<0,01), 3° (t=3,21, p<0,01) e 8° minutos (t=3,10, p<0,01).

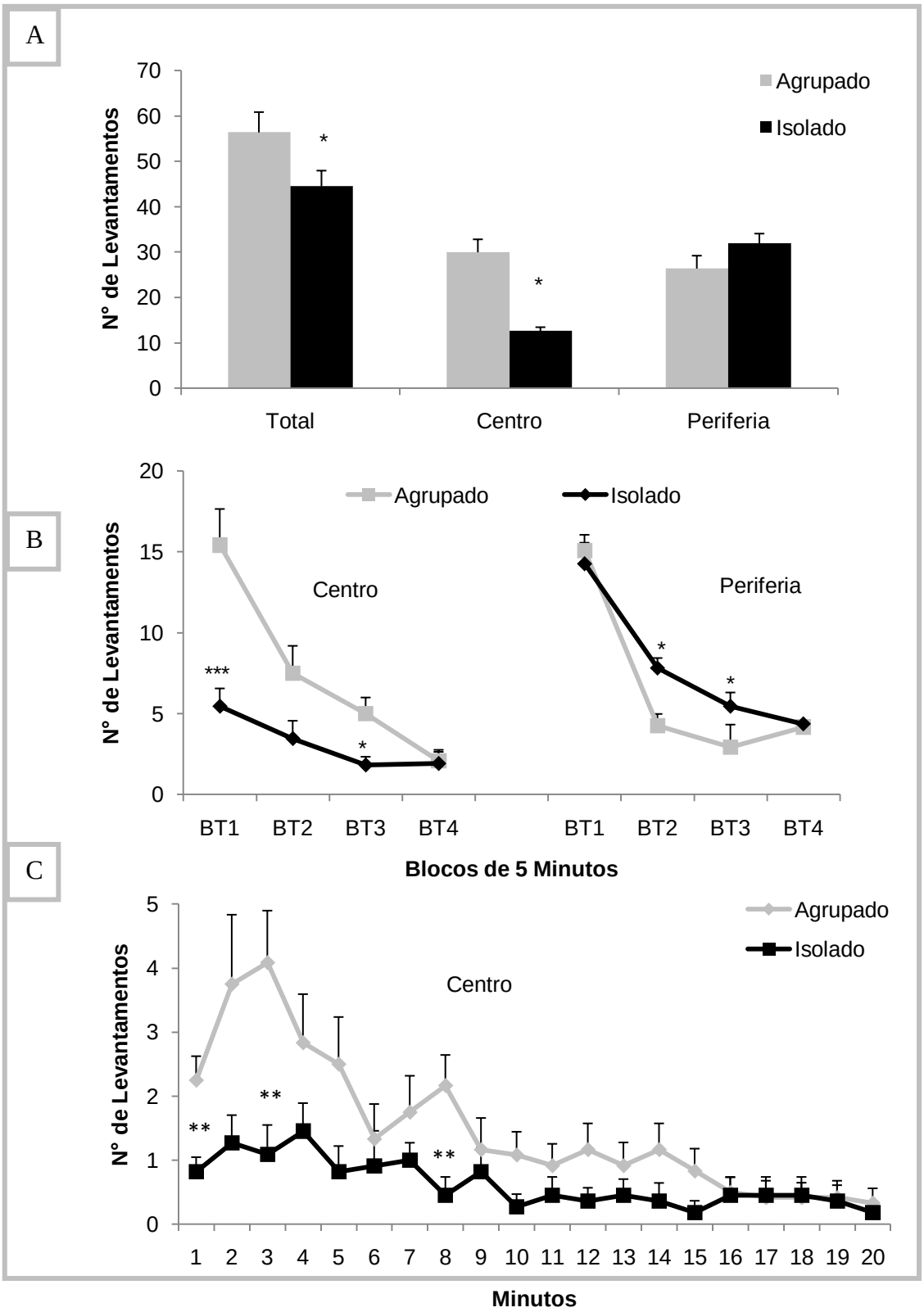

Figura 3 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade exploratória no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias±EPM do número total de levantamentos durante os 20 minutos de teste: (A) em toda a arena, no centro e na periferia, separadamente; (B) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos no centro e na periferia da arena; (C) em cada minuto no centro da arena. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001.

5.1.3- Tempo de permanência no centro e na periferia da arena em ratos criados em isolamento a partir do desmame.

O tempo despendido em cada região da arena durante os 20 minutos de teste está representado na figura 4 para os grupos isolado e controle (agrupado). A figura 4A demonstra que a criação em isolamento induziu uma redução estatisticamente significante no tempo total despendido no centro da arena em relação aos animais criados em grupo (54%; $F_{1,22}$=11,11; p<0,001). Como esperado, aumento estatisticamente significante foi encontrado no tempo total despendido na periferia da arena para os animais isolados em relação aos agrupados (65%; $F_{1,22}$=11,20; p<0,01).

Quando o tempo despendido em cada região da arena foi comparado entre os dois grupos experimentais em blocos de tempo de 5 min., diferença significante foi encontrada em todos os BTs (1-4) (Fig. 4B). No centro da arena os animais criados em isolamento despenderam menor tempo do que os animais criados em grupo (BT1: $F_{1,22}$= 9,18, p<0,01; BT2: $F_{1,22}$= 9,23 , p<0,01; BT3: $F_{1,22}$= 7,78 , p<0,05; BT4: $F_{1,22}$=5,13 , p<0,05), enquanto na periferia os animais isolados permaneceram por mais tempo do que os animais agrupados (BT1: $F_{1,22}$= 9,11, p<0,01; BT2: $F_{1,22}$= 9,23 , p<0,01; BT3: $F_{1,22}$= 7,78 , p<0,05; BT4: $F_{1,22}$=5,25 , p<0,05).

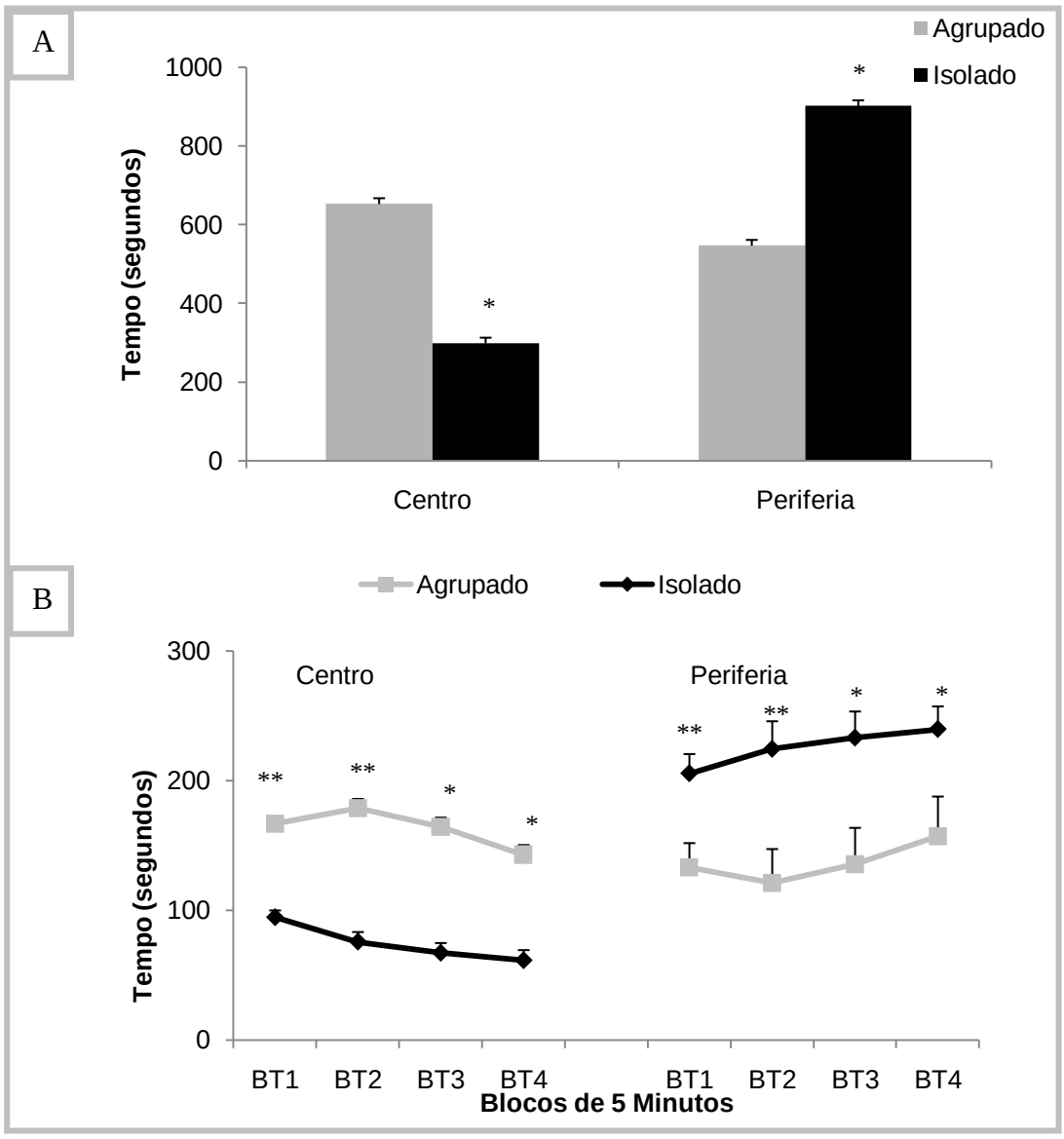

Figura 4 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre o tempo de permanência no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias±EPM: (A) do tempo total de permanência no centro e na periferia da arena durante os 20 minutos de teste; (B) em blocos de tempo (BT) de 5 minutos no centro e na periferia da arena. *p≤0,05; **p≤0,01.

5.2. Imunoistoquímica

5.2.1. Expressão de EAAC1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

As figuras 5 a 8 mostram a expressão dos transportadores de glutamato do tipo EAAC1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos controle (agrupados) ou criados em isolamento a partir do desmame. A densidade de células imunopositivas para EAAC1 (EAAC1-IC) no córtex pré-frontal e córtex entorrinal é qualitativamente demonstrada nas figuras 5 e 6, respectivamente, para todos os grupos experimentais. No córtex pré-frontal as EAAC1-IC estão distribuídas de forma esparsa em toda a região (Fig. 5A-F), enquanto no córtex entorrinal estas células se apresentam concentradas na camada II, com poucas células esparsas ao redor desta camada (Fig. 6A-F).

A análise quantitativa é demonstrada na figura 8 e podemos observar que a criação em isolamento induziu um aumento estatisticamente significante no número de EAAC1-IC no córtex pré-frontal. Este aumento foi de 38% ($t= 2,730$, $p=0,017$) quando o grupo isolado foi comparado ao agrupado. Entretanto, embora um número considerável de EAAC1-IC tenha sido observado no córtex entorrinal, principalmente na camada II, e um aumento de 17% nos animais isolados em relação aos agrupados, este aumento não foi estatisticamente significante ($t= 1,892$; $p= 0,081$).

A omissão do anticorpo primário anti-EAAC1 resultou em completa ausência de sinal em ambas as áreas analisadas (Fig. 7).

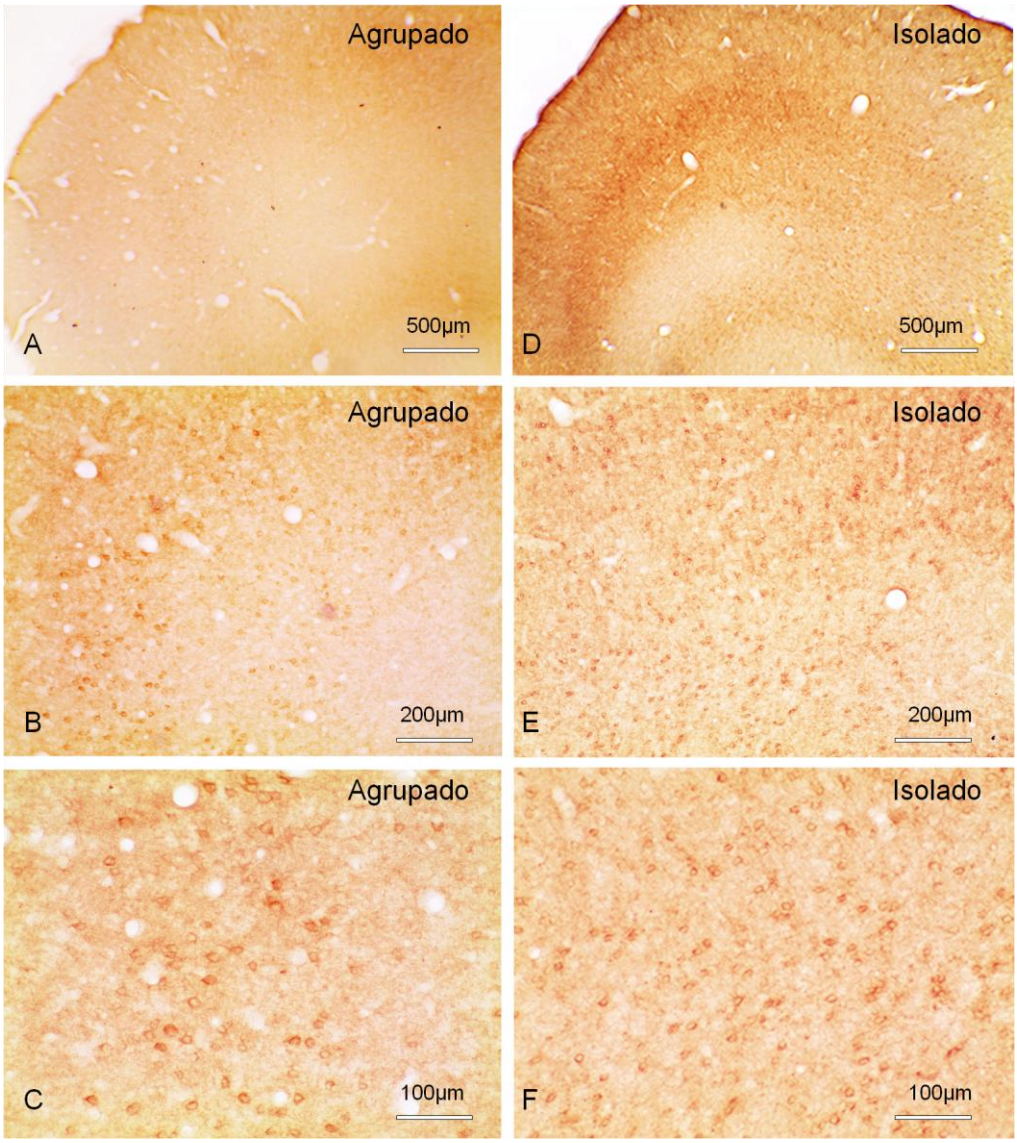

Figura 5 - Imunoistoquímica para os transportadores de glutamato EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle-agrupados (A-C) ou isolados a partir do desmame (D-F). Secções incubadas com o Anticorpo primário anti-EAAC1, Millipore (1:1000) e com o Anticorpo secundário Dako.

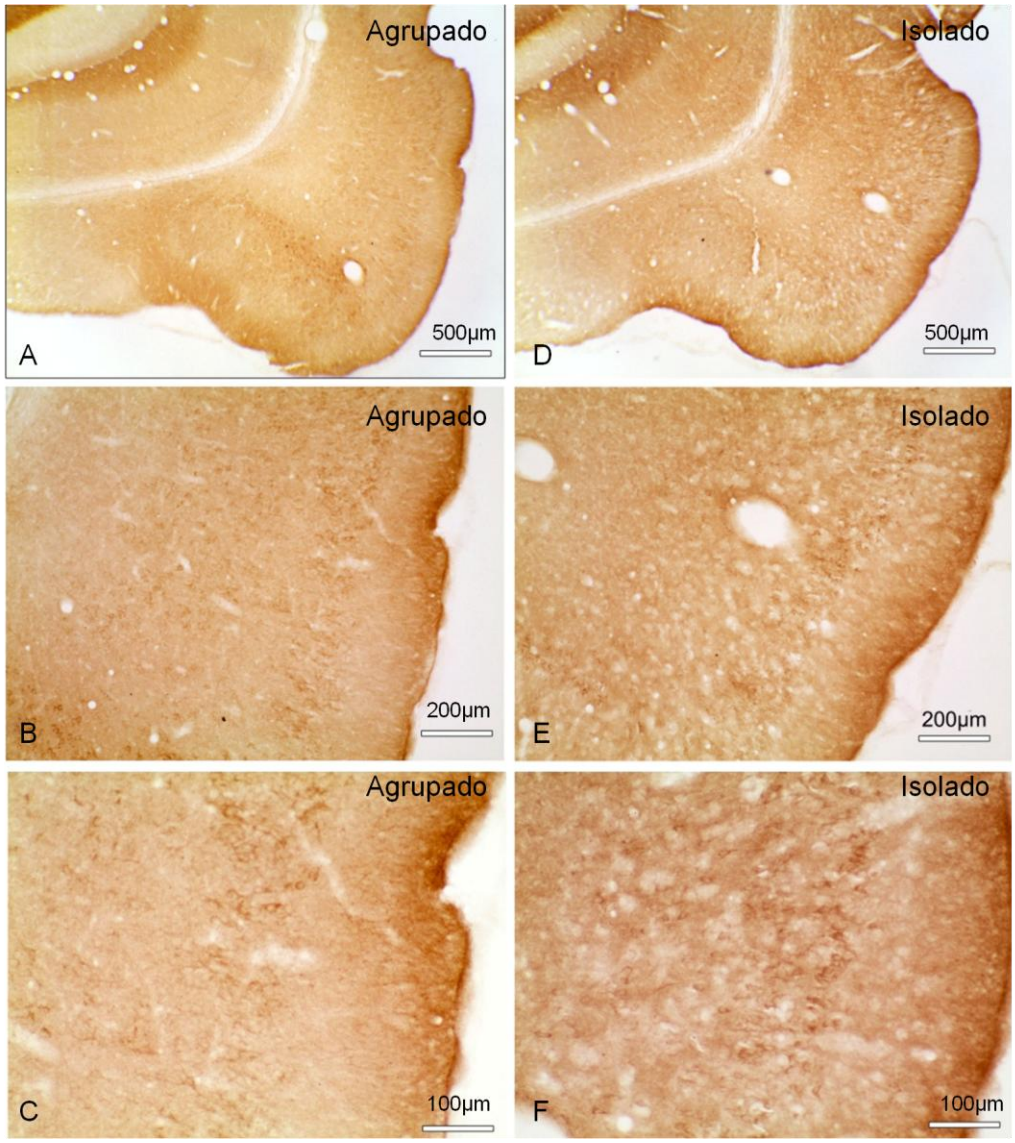

Figura 6 - Imunoistoquímica para os transportadores de glutamato EAAC1 no córtex entorrinal (CE) de ratos controle-agrupados (A-C) ou isolados a partir do desmame (D-F). Secções incubadas com o Anticorpo primário anti-EAAC1, Millipore (1:1000) e com o Anticorpo secundário Dako.

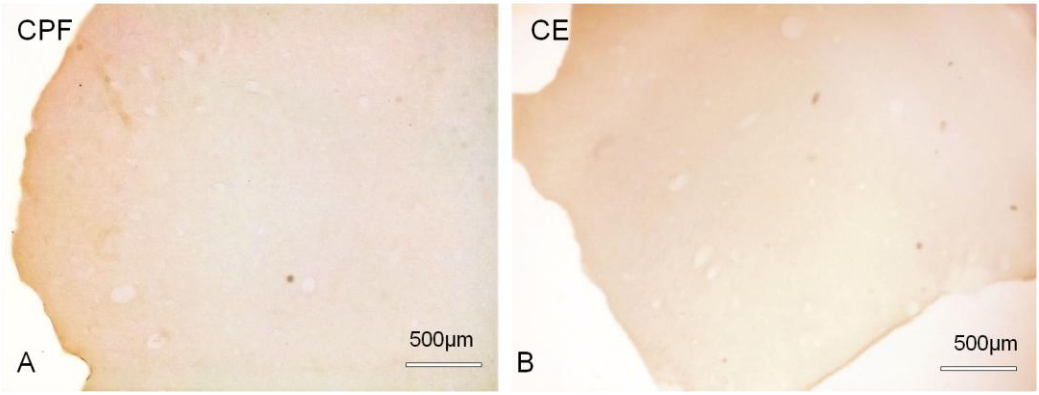

Figura 7 – Secções do córtex pré-frontal (A) e do córtex entorrinal (B) incubadas na ausência do Anticorpo primário anti-EAAC1.

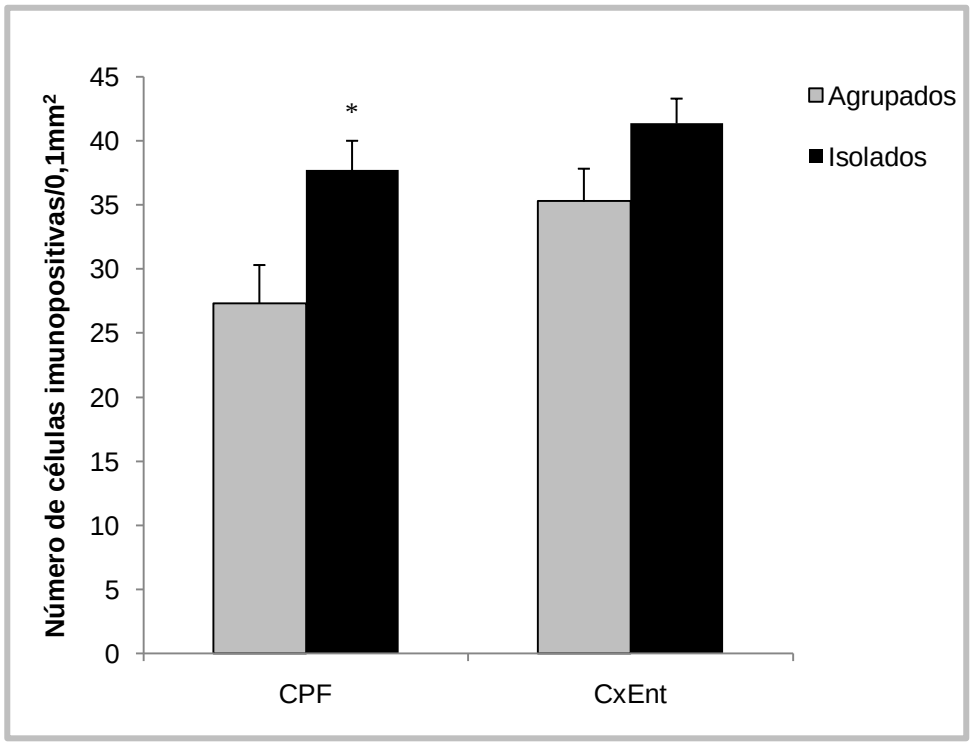

Figura 8 - Número de células imunopositivas para EAAC1 no córtex pré-frontal (CPF) e córtex entorrinal (CE) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame (n=8/grupo). Os dados representam a média±EPM do número de células imunopositivas/0,1mm^2, quantificadas bilateralmente, em 3 secções/animal. *p<0,05 (Teste "*t*" de Student).

5.2.2. Expressão de GLT1 no córtex pré-frontal de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

A expressão do transportador de glutamato do tipo GLT1 no córtex pré-frontal dos animais controle (agrupados) ou isolados a partir do desmame é apresentada nas figuras 9 a 11. Na figura 9, a análise qualitativa das células imunopositivas para GLT1 (GLT1-IC) em ambos os grupos experimentais mostra alta densidade deste transportador em células neuroniais do córtex pré-frontal, onde a distribuição das IC ocorre de forma esparsa em toda a área (Fig. 9A-F).

A análise quantitativa das GLT1-IC nesta região cortical, apresentada na figura 11, confirma uma alta expressão do transportador em células neuroniais nos grupos controle e isolado. Entretanto, a comparação estatística entre os dois grupos revelou que nenhuma diferença no número de GLT1-IC foi induzida pela criação em isolamento nesta área cerebral ($t=-1,28$; $p=0,210$).

A omissão do anticorpo primário anti-GLT1 resultou em completa ausência de sinal (Fig. 10).

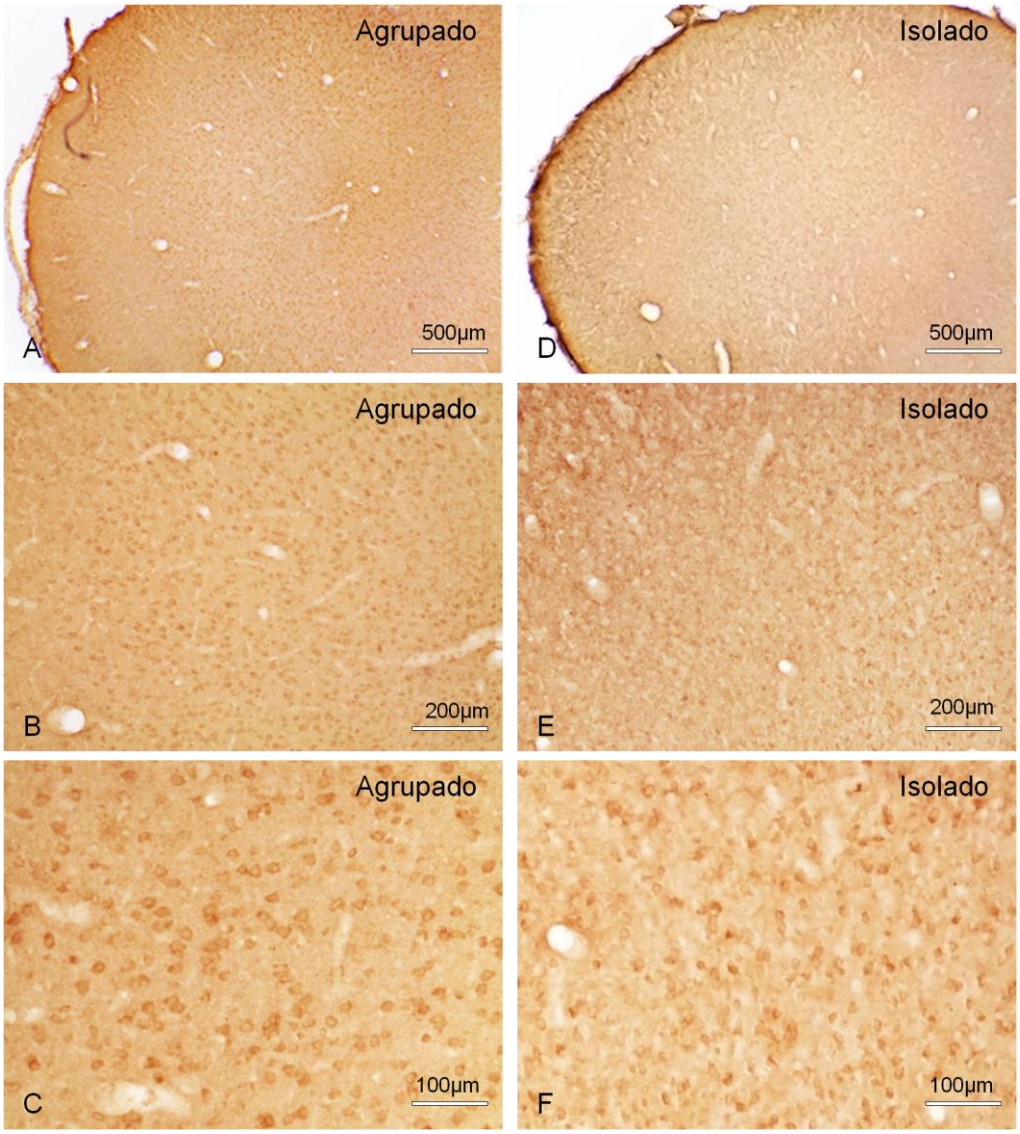

Figura 9 - Imunoistoquímica para os transportadores de glutamato (GLT1) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle-agrupados (A-C) ou isolados a partir do desmame (D-F). Secções incubadas com o Anticorpo primário anti-GLT1, Millipore (1:2000) e com o Anticorpo secundário Dako.

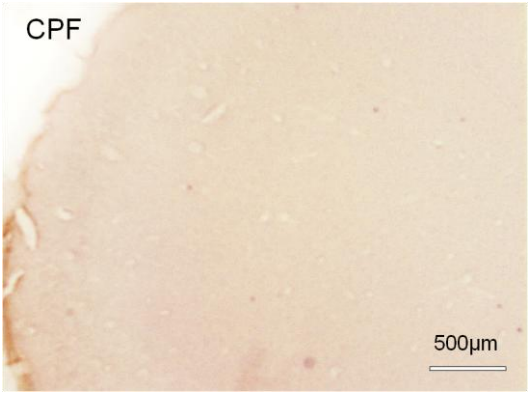

Figura 10 – Secção do córtex pré-frontal incubada na ausência do Anticorpo primário anti-GLT1.

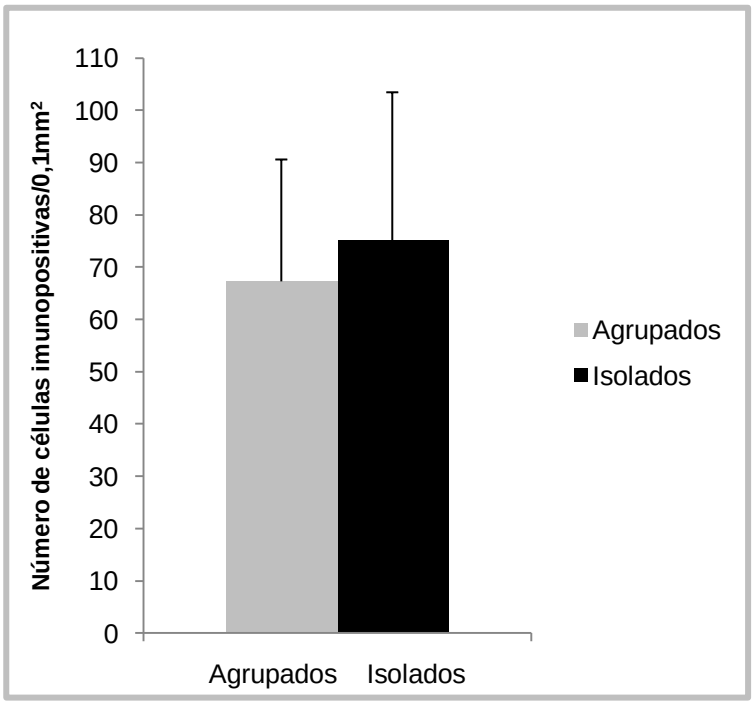

Figura 11 - Número de células imunopositivas para GLT1 no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle-agrupados ou isolados a partir do desmame (n=8/grupo). Os dados representam a média ± EPM do número de células imunopositivas/0,1mm^2, quantificadas bilateralmente, em 3 secções/animal. (Teste "*t*" de Student).

5.3. Fluorescência

5.3.1. Expressão de GLT1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

As figuras 12 a 15 mostram a expressão dos transportadores de glutamato do tipo GLT1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos controle (agrupados) ou criados em isolamento a partir do desmame. Utilizando dupla marcação por imunofluorescência, observamos uma marcação intensa, difusa e homogênea para o transportador GLT1 em ambas as áreas analisadas e para os 2 grupos experimentais. Esta marcação (vermelho) pode ser vista associada à presença de células gliais positivas para GFAP (verde) e núcleos marcados com DAPI (azul) quando analisamos a sobreposição das imagens (Fig. 12 e 13). Uma vez que não foi utilizado um marcador específico para neurônios, a presença de núcleos celulares (azul) não relacionados a células gliais (verde) sugere que a expressão de GLT1 pode estar associada a células neuroniais. Adicionalmente, a dupla marcação de GLT1 (vermelho) e Faloidina (verde), específica para citoesqueleto celular por meio da ligação com actina, confirma nossas observações quando analisamos a sobreposição das imagens. Em ambas as áreas cerebrais verificamos tanto a marcação difusa de GLT1 associada à marcação também difusa de citoesqueleto de glia e neurônio, como a ausência de GLT1 em regiões do tecido onde observamos a presença de secções de vasos sanguíneos (Fig. 14 e 15). A análise qualitativa dos resultados sugere que o isolamento a partir do desmame não induziu qualquer alteração na expressão de GLT1 tanto no CE como no CPF. Este último confirma a análise quantitativa apresentada no resultado anterior.

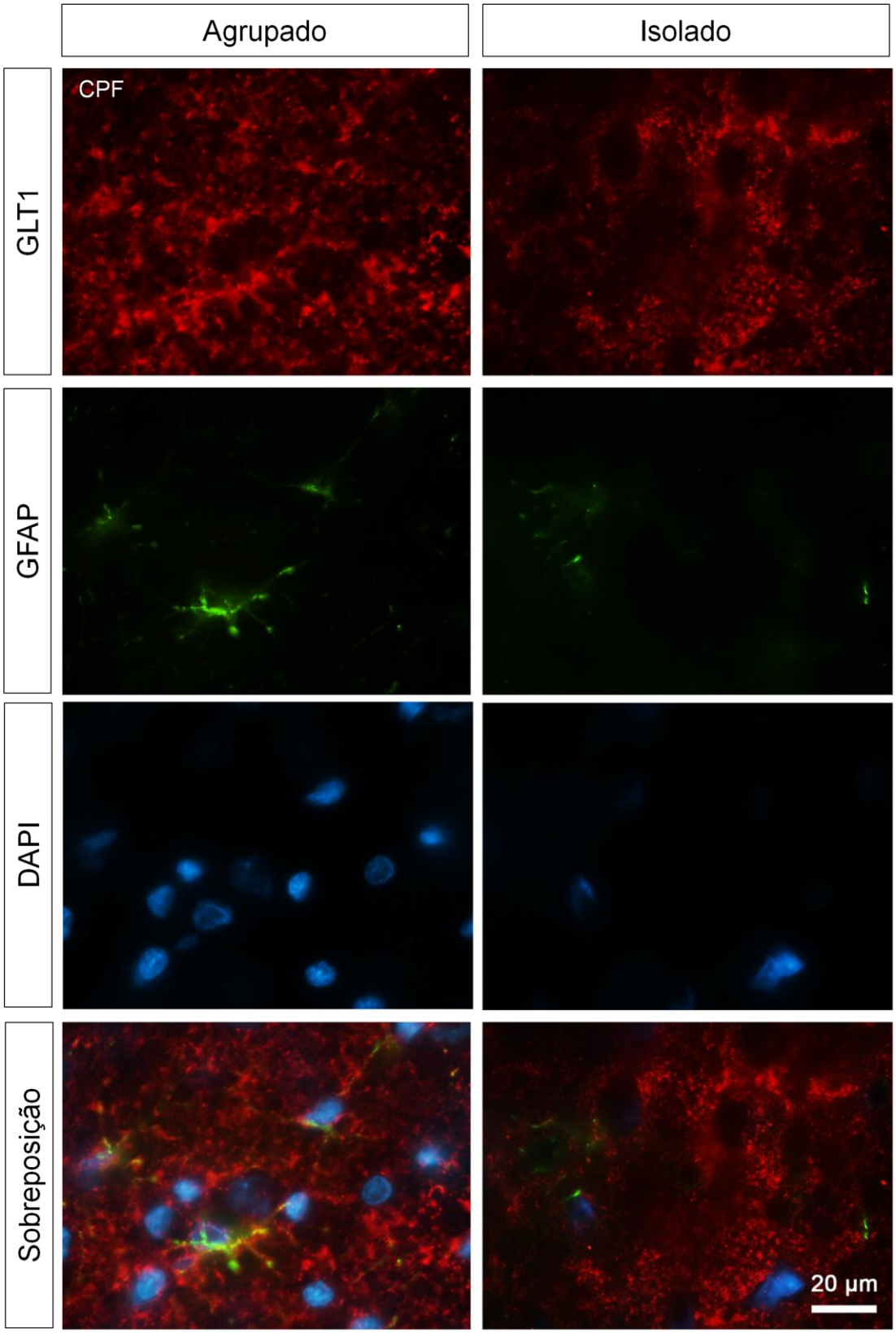

Figura 12: Dupla marcação imunofluorescente do transportador de glutamato GLT1 (vermelho) e células gliais – GFAP (verde) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle (agrupados) ou isolados a partir do desmame. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).

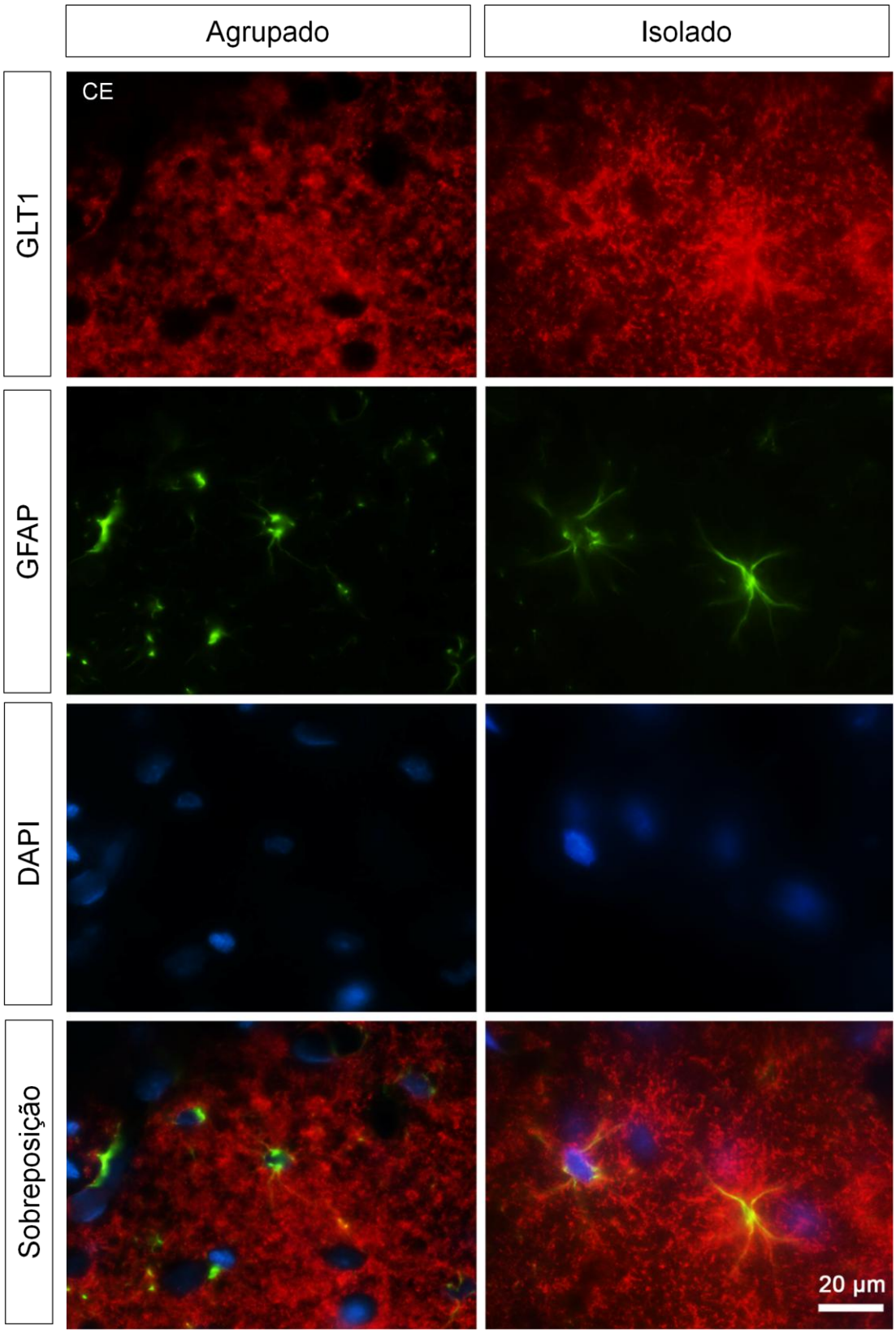

Figura 13: Dupla marcação imunofluorescente do transportador de glutamato GLT1 (vermelho) e células gliais – GFAP (verde) no córtex entorrinal (CE) de ratos controle (agrupados) ou isolados a partir do desmame. Núcleos celulares marcados com DAPI (azul).

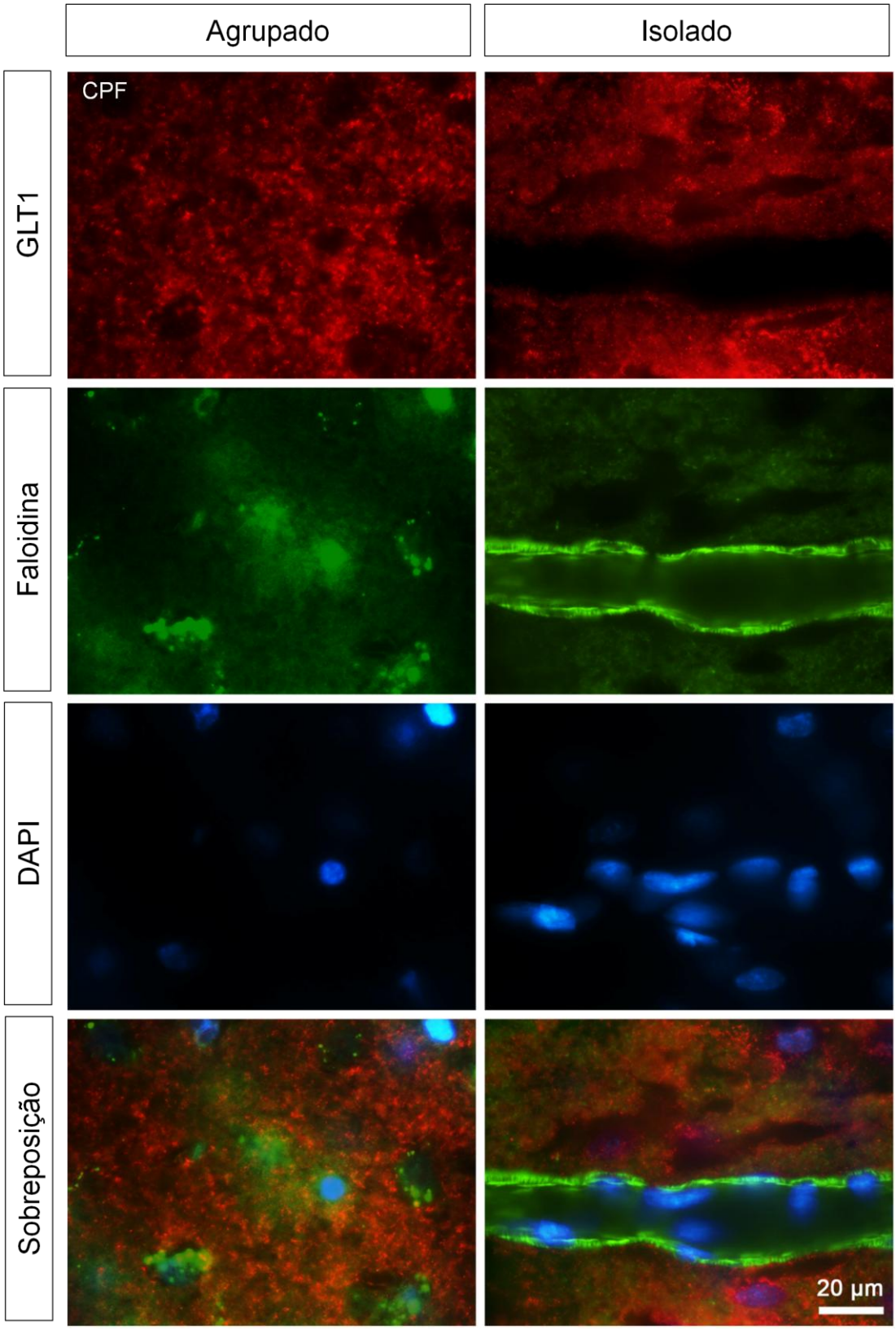

Figura 14: Imunofluorescência para o transportador de glutamato GLT1 (vermelho) e marcação fluorescente de citoesqueleto - Faloidina (verde) e de núcleos celulares – DAPI (azul) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos controle (agrupados) ou isolados a partir do desmame.

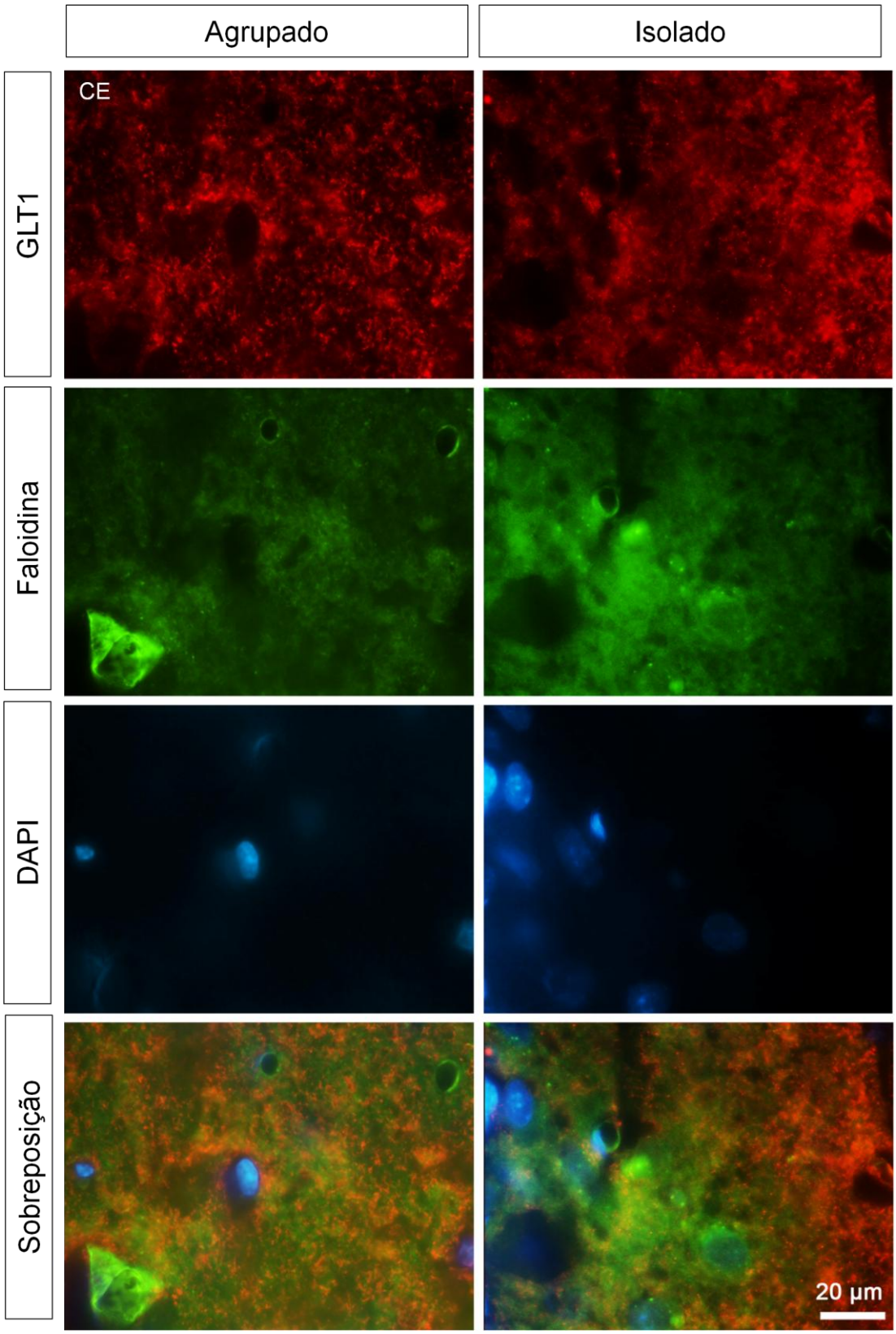

Figura 15: Imunofluorescência para o transportador de glutamato GLT1 (vermelho) e marcação fluorescente de citoesqueleto - Faloidina (verde) e de núcleos celulares – DAPI (azul) no córtex entorrinal (CE) de ratos controle (agrupados) ou isolados a partir do desmame.

6 DISCUSSÃO

6.1. Atividade locomotora e exploratória em ambiente novo de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

Inúmeros estudos têm utilizado o isolamento social de ratos durante oito a dez semanas após o desmame, período do desenvolvimento cerebral, como modelo experimental de doenças psiquiátricas como a esquizofrenia. Estes estudos têm demonstrado que esta forma de estresse afetivo produz uma série de alterações comportamentais de longa duração, que se manifestam nos animais na idade adulta (Weiss et al, 2004; Kim & Kirkpatrick; 1996; Arakawa, 2003; Reynolds & Harte, 2007). A hiperatividade em ambiente novo, assim como a inibição pelo pré-pulso do reflexo de sobressalto são as alterações comportamentais clássicas observadas em ratos criados em isolamento (Geyer et al., 1993; Varty & Higgins, 1995; Wilkinson, Killcross, Humby, Hall, Geyer, Robbins, 1994 ; Domeney & Feldon, 1998). Entretanto, em uma série de estudos sobre a atividade locomotora em ambiente novo, as avaliações são realizadas por curto período de tempo (5 minutos) e são registradas a atividade total na arena (Thorsell, Slawecki, Khoury, Mathe & Ehlers, 2006; Jong, Vegt, Buwalda & Koolhaas, 2005).

No presente estudo avaliamos a atividade locomotora e exploratória em ambiente novo (arena) de ratos submetidos ao isolamento durante 10 semanas a partir do desmame. Esta avaliação teve o objetivo de investigar o padrão de exploração apresentado por esses animais na região central e periférica da arena, separadamente, durante 20 minutos de teste. Sumariamente, nossos resultados mostraram que a criação em isolamento induziu uma hiperatividade locomotora (exploração horizontal) principalmente na periferia da arena e um aumento na atividade exploratória (exploração vertical) no centro da arena. A hiperatividade locomotora observada em nosso estudo está de acordo com diversos achados da literatura (Fone & Porkess, 2008; Weiss et al, 2004, 2000) nos quais a hiperatividade em ambiente novo é uma alteração comportamental clássica descrita para este modelo experimental (Willner, 1990). Entretanto, apesar da consistência destes achados, alguns autores não observaram alterações

semelhantes (Rosa et al, 2005; Arakawa, 2003), sendo esta discrepância intrigante quando os resultados são comparados com a vasta literatura relacionada. Assim, vários aspectos merecem ser discutidos considerando as diferenças encontradas entre os estudos experimentais realizados.

Resultados obtidos a partir de testes comportamentais podem ser influenciados por um conjunto de fatores relacionados às particularidades de cada condição experimental, específicas de cada laboratório de pesquisa. Estes fatores podem incluir a linhagem dos animais, os protocolos de manipulação, as condições do ambiente de isolamento, a sensibilidade ao ambiente do teste, ao aparato utilizado e ao teste comportamental *per si*, entre outros fatores que podem ser decisivos na reprodução dos efeitos comportamentais do isolamento.

Walsh e Cummins (1976) revisaram em detalhes as diversas variáveis que podem influenciar os resultados obtidos no teste do campo aberto, além dos fatores genéticos que refletem diferenças individuais entre os animais. As características físicas do aparato como tamanho, cor, forma, subdivisão, altura da parede, textura do chão, odor e localização da área onde o teste é iniciado podem ser diferentes entre os laboratórios e culminar em manifestações comportamentais também diferentes no campo aberto. Adicionalmente, o ambiente onde o teste é realizado pode apresentar variações que incluem a intensidade, a natureza (artificial ou natural) e a posição da luz, fontes de som e de odores, além da visibilidade e posição do observador. O mesmo ocorre com diversos detalhes do procedimento experimental e das características individuais de cada experimentador como observador. Dessa forma, ainda que as condições experimentais tenham sido padronizadas em cada laboratório, não há uniformidade nos procedimentos e nos resultados encontrados na literatura como um todo. De acordo com Walsh e Cummins (1976), isso ocorre parcialmente porque a maioria dos trabalhos citam apenas informações sucintas relativas ao método e aos procedimentos específicos utilizados. Este aspecto tem importância fundamental, uma vez que a diversidade de protocolos experimentais existentes torna difícil a comparação entre os estudos e a reprodução dos achados descritos na literatura (Stanford, 2007).

Considerando isso, os resultados deste estudo foram comparados principalmente àqueles obtidos em estudos que utilizaram protocolos experimentais semelhantes, os quais diferem eventualmente em alguns parâmetros como o tempo de exposição ao novo ambiente, a luz utilizada no ambiente do teste, as variáveis registradas, a linhagem dos animais, entre outros.

Considerando especificamente o tempo de exposição ao novo ambiente, Fone & Porkness (2008) sugeriram que a hiperatividade locomotora poderia ter sido observada se os animais tivessem sido expostos ao ambiente por um período mais longo de teste, suficiente para registrar um perfil temporal de atividade. Ao testarmos esta hipótese, os resultados do presente trabalho corroboraram esta ideia, uma vez que a atividade locomotora apresentada pelos animais criados em isolamento foi diferente daquela apresentada pelos animais controle a partir do segundo bloco de tempo, ou seja, após cinco minutos de teste, se mantendo até o quarto bloco de tempo, 18° minuto. Nossos achados sugerem que ratos da linhagem Wistar apresentam um perfil de atividade exploratória que se manifesta exacerbada somente se expostos ao ambiente novo por tempo superior a cinco minutos, quando a hiperatividade locomotora começa a ser registrada.

Considerando as diferentes linhagens, Fone e Porkess (2008) discutem que as alterações comportamentais descritas na literatura somente são reproduzíveis quando o isolamento social é aplicado à mesma linhagem de ratos. Dessa forma, ainda que duas linhagens diferentes sejam submetidas rigorosamente ao mesmo protocolo de isolamento e teste, as respostas comportamentais podem ser de diferentes intensidades ou até mesmo opostas. Weiss et al. (2000), utilizando as linhagens Lister hooded, Wistar e Sprague-Dawley, observaram que diferenças na sensibilidade aos estímulos se refletiam na atividade locomotora. Após o isolamento, o comportamento destes animais foi comparado durante 60 minutos na arena. Entretanto, os autores registraram a atividade locomotora total nos 60 minutos de teste, não sendo possível concluir se a hiperatividade induzida pela criação em isolamento, observada nas linhagens Wistar e Lister hooded, ocorreu uniformemente ao longo de todo o período ou em blocos específicos de tempo. Uma vez que em nosso estudo a duração total do

teste foi de 20 minutos, nossos resultados poderiam ser comparados apenas àqueles obtidos na primeira etapa do experimento de Weiss, caso o autor tivesse apresentado seus resultados em blocos de menor tempo.

Evidências opostas foram demonstradas por Arakawa et al. (2003) em estudo utilizando apenas a linhagem Wistar, no qual os animais criados em isolamento não apresentaram hiperatividade locomotora no campo aberto durante 20 minutos de teste. Como mencionado anteriormente, este comportamento também não foi observado em nossos estudos anteriores, confirmado em três experimentos independentes utilizando ratos Wistar, quando os animais foram testados no campo aberto por 5 minutos (Rosa et al., 2005) ou 15 minutos (dados não publicados). Adicionalmente, outro achado semelhante entre nosso estudo e o de Arakawa (2003) foi o padrão mais ativo do comportamento exploratório apresentado pelos animais isolados relatado pelo autor, representado por um número maior de entradas no centro da arena quando comparado aos animais agrupados. Outras diferenças comportamentais apresentadas por ratos de diferentes linhagens criados em isolamento foram descritas por vários pesquisadores para outros parâmetros analisados, como o déficit de atenção, analisado através do teste de inibição pelo pré-pulso (PPI) da resposta de sobressalto (Rosa et al, 2005; Domeney & Feldon, 1998; Weiss, Feldon & Domeney, 1999).

O conjunto das evidências acima sugere que ratos da linhagem Wistar criados em isolamento a partir do desmame podem ser mais resistentes em desenvolver a sensibilidade a estímulos necessária para induzir respostas comportamentais de hiperatividade e déficit de atenção.

No contexto das atividades locomotora e exploratória, as comparações significantes entre os grupos experimentais encontradas neste estudo se devem principalmente às análises realizadas, separadamente, na periferia e no centro da arena. O aumento da atividade locomotora nos animais isolados foi registrada apenas na periferia da arena e se refletiu em um aumento na atividade locomotora total. Em contraste, a redução no número de levantamentos (atividade exploratória) observada nos animais isolados no centro da arena nos primeiros 15 minutos de teste se refletiu em redução no número total de levantamentos em 20 minutos, mesmo com o aumento registrado na periferia entre 10 e 15 minutos. Adicionalmente,

quando o tempo de permanência foi também analisado nas 2 áreas da arena separadamente observou-se clara preferência dos animais criados em isolamento pela periferia da arena durante todo o tempo do teste, o que reflete um efeito ansiogênico do isolamento (Weiss et al, 2004; Fone & Porkess, 2008). Este efeito foi posteriormente confirmado em nosso laboratório pela análise do comportamento no labirinto em cruz elevado de animais submetidos ao mesmo protocolo de isolamento social (artigo em preparação). Estes resultados permitem ainda estabelecer relações com os sintomas negativos da esquizofrenia, os quais estão associados à diminuição ou perda das funções normais que se manifestam como embotamento afetivo, restrições na fluência de raciocínio, anedonia (inabilidade em experimentar prazer), retraimento social e diminuição da motivação e da iniciativa (APA, 2000).

6.2. Expressão de EAAC1 e GLT1 no córtex pré-frontal e córtex entorrinal de ratos criados em isolamento a partir do desmame

Um grande conjunto de evidências sugere que a esquizofrenia é uma desordem que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e tem sido demonstrado que os genes mais claramente envolvidos na esquizofrenia codificam proteínas que potencialmente tem um impacto, direta ou indiretamente, na função das sinapses glutamatérgicas. Estas funções sugerem que estas sinapses podem ser o sitio primário das anormalidades que ocorrem na esquizofrenia, sendo as alterações dopaminérgicas provavelmente secundárias à transmissão glutamatérgica cortical modificada (Carlsson & Carlsson, 1990; Davis et al., 1991).

É classicamente sabido que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, presente em cerca de 30-40% das sinapses no SNC de mamíferos e provavelmente em 80-90% das sinapses em áreas envolvidas em processos cognitivos como o córtex e hipocampo (Danbolt, 2001). O sistema glutamatérgico está envolvido na maioria dos processos cerebrais associados com funções sensoriais, neurovegetativas, límbicas e

cognitivas; e possui papel fundamental durante o desenvolvimento. Disfunções desta neurotransmissão tem sido descritas em várias doenças cerebrais, geralmente associadas a impedimentos das funções cerebrais envolvendo um excesso da transmissão excitatória como na epilepsia, doença de Parkinson e de Alzheimer, ou em algumas formas de esquizofrenia (Nieoullon et al., 2006).

A manutenção da função sináptica glutamatérgica normal, assim como a sobrevivência neuronial assegurada pela proteção contra a excitotoxicidade resultam da regulação da concentração do glutamato no meio extracelular pelos transportadores de glutamato (Danbolt, 2001; Rosenberg & Aizenman, 1989; Rosenberg, Amin, & Leitner, 1992; Rothstein & Tabakoff, 1994; Tanaka et al., 1997). Considerando a distribuição destes transportadores em animais, o GLAST/EAAT1 e o GLT1/EAAT2 estão localizados em células gliais (astrócitos) enquanto o EAAC1/EAAT3 está localizado em células neuroniais (Danbolt, 2001). Entretanto, evidências recentes demonstram que esta localização, embora predominante, não é exclusiva (Chen et al., 2002). A ação coordenada destas células é necessária para regular a concentração de glutamato extracelular, prevenindo seu acúmulo, que pode levar à diminuição da transmissão sináptica por dessensibilização do receptor e neurodegeneração (Lortet, Canolle, Masmejean & Nieoullon, 2008). Foi também demonstrado que a expressão dos transportadores em tipos celulares específicos varia com o período do desenvolvimento cerebral. Por exemplo, Guillet, Lortet, Masmejean, Samuel, Nieoullon e Pisano (2002) descreveram o perfil de expressão do desenvolvimento dos transportadores EAAC1 e da atividade de recaptação em culturas corticais primárias de rato. Logo no início do experimento, os pesquisadores puderam observar a expressão de EAAC1 (entre 3 e 14 dias *in vitro* – DIV), que apresentou um leve declínio após alguns dias (10 DIV). Por outro lado, a expressão do transportador glial GLT1 foi detectada apenas após 7 dias de experimento (7 DIV). Esses dados reforçam a ideia de que os transportadores neuroniais do tipo EAAC1 são responsáveis por manter baixas as concentrações extracelulares de Glu nos primeiros estágios de desenvolvimento do tecido em cultura, enquanto os transportadores gliais ainda não têm uma atuação eficiente. Este aspecto

sugere a participação destes transportadores, neuronais e gliais, na regulação da mediação glutamatérgica nos processos fisiológicos e patológicos que ocorrem durante o neurodesenvolvimento, como a esquizofrenia.

Os resultados obtidos neste estudo utilizando o modelo experimental de esquizofrenia, isolamento de ratos a partir do desmame durante todo o período do desenvolvimento cerebral, podem ser sumariamente definidos por um aumento na expressão do transportador de glutamato neuronial EAAC1 no CPF dos animais isolados. Adicionalmente, os resultados da imunoistoquímica revelada por DAB também mostram a expressão de GLT1 nesta área cerebral e de EAAC1 no CE, embora a expressão de ambos não tenha sido significantemente alterada pelo isolamento. Nosso trabalho apresenta evidências que reforçam dados da literatura sugerindo que a recaptação anormal de glutamato está envolvida na fisiopatologia da esquizofrenia (Bauer et al., 2010). O aumento na expressão de EAAC1 no CPF induzido pelo isolamento sugere um aumento na remoção do glutamato liberado na fenda sináptica reduzindo sua concentração no meio extracelular, coerente com a hipofunção desta neurotransmissão descrita na esquizofrenia (Harrisson, Law e Eastwood, 2003).

Neste contexto, estudos realizados em cérebros *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos mostram uma redução na mediação glutamatérgica, através dos diferentes receptores, em várias regiões cerebrais e sugerem que esta redução pode contribuir para o prejuízo cognitivo observado na esquizofrenia (Cummings & Mega, 2003). Por exemplo, evidências experimentais permitem que a disfunção dos receptores NMDA seja associada a esta patologia, uma vez que estes receptores possuem um papel crítico em guiar os axônios aos seus alvos durante o desenvolvimento (Rakic, Bourgeois, & Goldman-Rakic, 1994). Os receptores NMDA podem estar envolvidos na arborização sináptica que ocorre na adolescência, principal idade em que ocorre a manifestação da esquizofrenia (Feinberg, 1990) e também na importante plasticidade que ocorre nas funções cognitivas (Daw, Stein & Fox, 1993). Foi também demonstrado que o estresse crônico modula a expressão dos receptores NMDA envolvidos na interação do CPF com estruturas límbicas associadas a funções cognitivas e

afetivas (Lee & Goto, 2011). Em adição aos NMDAs, múltiplos subtipos de receptores de glutamato possuem interrelações funcionais que resultam em uma complexa e integrada regulação da neurotransmissão glutamatérgica. Os receptores AMPA são responsáveis pela transmissão rápida e por permitir o disparo dos receptores NMDA. Portanto, a hipofunção dos AMPA na esquizofrenia pode levar também à hipofunção dos receptores NMDA (Benes, 2000). De acordo com esta hipótese, Eastwood et al. (1995) demonstraram uma redução na expressão das subunidades GluR1 e GluR2 dos receptores AMPA no hipocampo de pacientes esquizofrênicos. Posteriormente, foi também demonstrado que especificamente as subunidades GluR1 dos receptores AMPA possuem um papel crítico na mediação da plasticidade sináptica e na cognição (Malenka, 2003; Malinow & Malenka, 2002).

Recentemente, utilizando modelo experimental de esquizofrenia, Sestito e cols. (2011) demonstraram reduzida expressão dos receptores AMPA, GluR1 e GluR2, principalmente no hipocampo de ratos criados em isolamento a partir do desmame. Foi também observado em camundongos geneticamente modificados com ausência da subunidade GluR1, alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas à esquizofrenia, tais como hiperatividade em um novo ambiente, déficit de atenção e aumento da função dopaminérgica no estriado (Wiedholz e cols., 2008).

Considerando a modulação da neurotransmissão glutamatérgica pelos transportadores de glutamato, o transportador EAAC1 foi demonstrado estar uniformemente distribuído nas células neuroniais de duas formas, como uma coloração tipicamente pontuada sugerindo sua presença em vesículas (Rothstein et al., 1994; Conti, DeBiasi, Minelli, Rothstein & Melone, 1998) e na superfície das células (Guillet et al, 2005; Lortet et al., 2008). Esta característica está de acordo com inúmeras evidências demonstrando que o EAAC1 pode ser regulado pela redistribuição da proteína transportadora de um compartimento subcelular para a membrana celular por vários fatores (Davis et al., 1998; Fournier, Gonzalez & Robinson, 2004; Nieoullon et al., 2006). Por exemplo, foi demonstrado que a potenciação de longa duração (LTP – long term potentiation) ou o medo contextual condicionado aumenta a concentração de EAAC1 na membrana plasmática

(Lavenson et al., 2002). Adicionalmente, a modulação dos transportadores gliais (GLT1 e GLAST) também ocorre pela alteração da expressão de EAAC1 na superfície celular (Guillet et al., 2005).

Considerando os resultados obtidos neste estudo para a expressão dos transportadores neuroniais no córtex entorrinal, observamos que a criação em isolamento não induziu qualquer alteração na expressão de EAAC1 nesta área cerebral. Evidências experimentais anteriores demonstraram o envolvimento do glutamato nos mecanismos ativados por diferentes tipos de estresse em várias áreas cerebrais incluindo o córtex entorrinal (Sestito et al, 2010; Padovan, Del Bel & Guimarães, 2000). A partir desta área o glutamato induz aumento da excitabilidade e vulnerabilidade dos neurônios da formação hipocampal em resposta ao estresse severo e recorrente (Rosa et al., 2002). Entretanto, nossos resultados sugerem que a regulação da neurotransmissão glutamatérgica no córtex entorrinal pelos transportadores de glutamato neuroniais não está envolvida nas respostas cerebrais induzidas pelo estresse afetivo de isolamento a partir do desmame.

O GLT1 é o principal transportador de aminoácidos excitatórios no cérebro e representa 1% da proteína cerebral total (Desilva et al., 2008). No cérebro adulto os astrócitos possuem papel fundamental na regulação da concentração de glutamato nas sinapses excitatórias através dos transportadores de glutamato (Lehre & Danbolt, 1998). Devido à presença predominante de GLT1 nestas células, os astrócitos tem sido considerados o tipo celular mais importante na manutenção da homeostasia do glutamato (Rosenberg & Aizenman, 1989; Rosenberg et al.,1992). Somente recentemente foi demonstrada a presença de GLT1 também em neurônios (Chen et al., 2004), podendo através destas células contribuir de forma importante para a retirada do glutamato das sinápses. Neste contexto, vários trabalhos tem descrito a existência de isoformas da proteína, denominadas GLT1a e GLT1b, presentes em células neuronais, gliais ou ambas, na dependência do desenvolvimento cerebral e de condições fisiológicas ou patológicas (Chen et al., 2002). Assim, embora células gliais, especialmente os astrócitos, possuem um papel chave na remoção do glutamato da fenda sináptica, os neurônios também contribuem para este processo (Danbolt,

2001; Nieoullon et al, 2006). Os resultados do presente estudo corroboram os achados da literatura além de contribuírem com evidências adicionais para esta hipótese, uma vez que uma alta expressão de GLT1 foi observada em células neuroniais do CPF. Entretanto, a análise quantitativa destas células imunopositivas demonstrou que a expressão de GLT1 nesta área cerebral não foi alterada pela criação dos animais em isolamento. Uma vez que a imunoistoquímica revelada por DAB não permitiu uma análise segura da expressão deste transportador no CE (resultados não apresentados), esta avaliação foi também realizada por imunofluorescência utilizando dupla marcação para GLT1 e células gliais. Os resultados demonstraram que tanto no CPF como no CE a expressão deste transportador é intensa, difusa e homogênea e que, além de células gliais, está associado a células neuroniais em ambas as áreas cerebrais. Estes resultados em conjunto com o diferente padrão de marcação observado com a DAB para este transportador no CPF e CE contribuem com os achados de Chen et al. (2002) para a existência de diferentes isoformas de GLT1 em tipos celulares distintos no CPF e CE no cérebro adulto. Adicionalmente, esta análise qualitativa reforça nossos resultados anteriores para o CPF de que a criação em isolamento não induziu qualquer alteração na expressão de GLT1 em neurônios, sugerindo que nestas células este transportador provavelmente não participa de forma relevante na regulação da mediação glutamatérgica como consequência destas condição.

Entretanto, um outro foco de investigação têm descrito que a regulação da expressão dos transportadores na membrana de neurônios é influenciada por fatores liberados das células gliais (Canolle, Masmejean, Melon, Nieoullon, Pisano & Lortet., 2004) e que o inverso também ocorre (Poitry-Yamate, Vutskits & Rauen, 2002), mostrando que há uma regulação recíproca entre estes dois tipos celulares que aparentemente exercem a mesma função, ou seja, a eliminação do glutamato da fenda sináptica. Vários estudos têm demonstrado que a complexa regulação da atividade dos transportadores de glutamato pode ocorrer no nível da transcrição, da tradução ou na localização dos transportadores em associação com proteínas regulatórias (Nieoullon et al., 2006; Beart & O'Shea, 2007). Entretanto, ainda não se sabe como estes transportadores trabalham em

conjunto para controlar a concentração de glutamato extracelular. Os recentes achados de Lortet e cols. (2008) demonstram que esta complexa regulação depende da maturação neuronial e pode variar de acordo com seu estágio.

Assim, considerando as alterações cerebrais que ocorrem como consequência da criação de ratos em isolamento durante todo o período do desenvolvimento cerebral, associadas ao envolvimento de diferentes mecanismos glutamatérgicos nos vários estágios de maturação cerebral, as alterações ou não na expressão dos transportadores de glutamato no CPF e CE encontradas neste estudo refletem as consequências do isolamento apenas no cérebro completamente maduro.

Nossos achados estão também de acordo com a literatura no que diz respeito a considerar a esquizofrenia como uma síndrome de "hipofrontalidade". Esse conceito se baseia em estudos que demonstram anormalidades na estrutura e função dos lobos frontais, contribuindo para a disfunção cognitiva observada nesta patologia (Butler et al., 2012; Dazzan et al., 2011; Callicott et al., 2000). Além disso, diversas evidências apontam correlações com a presença e severidade dos sintomas negativos observados na esquizofrenia (Liddle, Friston, Frith, Hirsch & Frackowiak, 1992). Atualmente considera-se que a esquizofrenia reflete uma disfunção em regiões específicas, como as porções dorsolateral e ventrolateral do córtex pré-frontal e o córtex cingulado anterior. Essas áreas cerebrais são críticas para o controle cognitivo, planejamento e memória de trabalho (Cummings & Mega, 2003).

O conjunto de evidências apresentadas na literatura para a participação dos transportadores de glutamato do CPF nos mecanismos envolvidos na esquizofrenia contribui de forma importante para a possibilidade de os transportadores de glutamato serem um futuro alvo terapêutico no tratamento desta patologia.

7 CONCLUSÕES

Os resultados comportamentais apresentados no presente trabalho corroboram e complementam os dados da literatura demonstrando que ratos mantidos em isolamento a partir do desmame e durante todo o período do desenvolvimento cerebral apresentam hiperatividade em ambiente novo (campo aberto ou arena).

Entretanto, os resultados sugerem que ratos da linhagem Wistar criados nestas condições são mais resistentes em desenvolver este comportamento quando expostos ao ambiente por curto espaço de tempo. A hiperatividade é detectada quando os animais são expostos por um período mais longo.

Adicionalmente, os resultados demonstram que ratos Wistar isolados a partir do desmame apresentam um padrão de exploração com clara preferência pela periferia da arena, refletindo o efeito ansiogênico do isolamento, o que permite estabelecer uma correlação com os sintomas negativos da esquizofrenia.

Assim, a exposição por tempo prolongado no ambiente novo (arena) e a análise separada da atividade locomotora na periferia e no centro da arena devem ser consideradas quando ratos Wistar forem utilizados no modelo experimental de isolamento a partir do desmame.

Os resultados moleculares apresentados no presente trabalho contribuem com evidências adicionais para a redução da mediação glutamatérgica no córtex pré-frontal de ratos criados em isolamento a partir do desmame.

O aumento da expressão dos transportadores de glutamato EAAC1 no córtex pré-frontal destes animais leva a um aumento da remoção do glutamato liberado na fenda sináptica, acelerando seu término de ação.

Estes resultados dão suporte à disfunção da mediação glutamatérgica que ocorre na esquizofrenia e contribuem com a literatura ao considerar esta neuropatologia uma síndrome de "hipofrontalidade".

A expressão dos transportadores de glutamato GLT1 não foi alterada em neurônios do córtex pré-frontal de ratos criados em isolamento partir do desmame, sugerindo que nestas células este transportador provavelmente não participa de forma relevante na regulação da mediação glutamatérgica como consequência desta condição.

A expressão dos transportadores de glutamato GLT1 foi demonstrada ser intensa, difusa e homogênea no córtex pré-frontal e córtex entorrinal, associada tanto a células gliais como neuroniais, sugerindo uma regulação complexa e recíproca entre estes dois tipos celulares na eliminação do glutamato da fenda sináptica.

Futuras investigações: Estudar, sob diferentes focos, a participação dos transportadores de glutamato nos mecanismos de modulação da mediação glutamatérgica na esquizofrenia. O aprimoramento deste conhecimento pode contribuir para considerar os transportadores de glutamato como um futuro alvo terapêutico no tratamento desta psicopatologia.

REFERÊNCIAS [1]

[1] De acordo com o estilo APA - American Psychological Association

Aghajanian, G. K., & Marek, G. J. (2000). Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate. *Brain Research Reviews*, *31*, 302-312.

Almeida, R. F., Thomazi, A. P., Godinho, G. F., Saute, J. M., Wofchk, S. T., Souza, D. O. et al. (2010) Effects of Depressive-Like Behavior of Rats on Brain Glutamate Uptake. *Neurochem Res*. 35.8. 1164-1171.

Almeida-Filho, N., Mari, J.J., Coutinho, E., França, J.F., Fernandes, J., Andreoli, S.B. & Busnello, E.D. (1997) Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity: methodological features and prevalence estimates. Br J Psych, 171: 524-9.

Andreasen, N.C. (1982) Negative symptoms in schizophrenia: definition and reliability. Arch Gen Psychiatry; 39:784–788.

Angrist, B. M.; Lee, H. K. & Gershon, S. (1974). The antagonismof amphetamine-induced symptomatology by a neuroleptic. *American Journal of Psychiatry, 131*. 817-819

Aoyama K, Suh S.W., Hamby, A.M., Liu, J,, Chan, W.Y., Chen, Y., Swanson, R.A. (2006) Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. Nat Neurosci. 9:119–126.

Arakawa, H. (2003) The effect of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. Developmental Psychobiology. 43. 11–19.

Associação Psiquiátrica Americana - APA (2000) Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-IV-TR. 4° ed. Revisada. Porto Alegre: Artmed.

Baker. F.M (1989) Cocaine psychosis. Journal of the National medical association. 81, 987-1000.

Banasr, M., Chowdhury, G. M., Terwilliger, R., Newton, S. S., Duman, R. S., Behar, K. L, Sanacora G. (2010) Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular , metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Molecular Psychiatry*, *15*. 501-511.

Bardgett, M.E., Jackson, J.L., Taylor, B.M. & Csernansky, J.G.. (1998) The effects of kainic acid lesions on locomotor responses to haloperidol and clozapine. *Psychopharmacology (Berl)*. Feb;135(3):270-8.

Bauer, D., Haroutunian, V., Meador-woodruff, J. H., & Mccullumsmith, R. E. (2010). Abnormal glycosylation of EAAT1 and EAAT2 in prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *117*, 92-98.

Beart, P.M. & O'Shea, R.D. (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. Br J Pharmacol. 150(1):5-17.

Benarroch, E. E. (2010) Implications of Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology*, *74*. 259-264.

Benes, F.M. (2000) Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. Brain Res Brain Res Rev. 31(2-3):251-69.

Beneyto, M., Kristiansen, L. V., Oni-orisan, A., Mccullumsmith, R. E., & Meador-woodruff, J. H. (2007). Abnormal Glutamate Receptor Expression in the Medial Temporal Lobe in Schizophrenia and Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, *32*, 1888-1902. doi: 10.1038/sj.npp.1301312.

Bergles, D. E., Diamond J. S. and Jahr C. E. (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol*. 9, 293–298.

Berton, O. & Nestler, E. J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Rev. Neurosci*. 7, 137–151.

Bianchi, M., Fone, K. F., Azmi, N., Heidbreder, C. A., Hagan, J. J., Marsden, C. A., et al. (2006) Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience. 24.* 2894-2902.

Blanchard, R. J., Mckittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001) Animal models of social stress : Effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior. 73.* 261-271.

Bortolotto Z. A., Fitzjohn S. M. & Collingridge G. L. (1999) Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippo- campus. *Curr. Opin. Neurobiol*. 9, 299–304.

Braff, D., Stone, C., Callaway, E., Geyer, M., Glick, I., Bali, L. (1978) Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15, 339–343.

Butler, T., Weisholtz, D., Isenberg, N., Harding, E., Epstein, J., Stern, E., et al. (2012). Neuroimaging of frontal-limbic dysfunction in schizophrenia and epilepsy-related psychosis: Toward a convergent neurobiology. Epilepsy & Behavior, 23, 113-122.

Callicott, J. H., Bertolino, A., Mattay, V. S., Langheim, F. J., Duyn, J., Coppola, R., et al. (2000). Physiological Dysfunction of the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia Revisited. Cerebral Cortex, 10, 1078-1092.

Canolle, B., Masmejean, F., Melon, C., Nieoullon, A, Pisano, P. & Lortet S. (2004) Glial soluble factors regulate the activity and expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1: implication of cholesterol. J Neurochem.88(6):1521-32.

Carlsson, M, & Carlsson, A, (1990) Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr Bull* 16:425-432

Chen, W., Aoki, C., Mahadomrongkul, V., Gruber, C. E., Wang, G. J., Blitzblau, R., et al. (2002). Expression of a Variant Form of the Glutamate Transporter GLT1 in Neuronal Cultures and in Neurons and Astrocytes in the Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*, *22*(6), 2142-2152.

Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U. V., Bassan, M., Desilva, T., Tanaka, K., et al. (2004). The Glutamate Transporter GLT1a Is Expressed in Excitatory Axon Terminals of Mature Hippocampal Neurons. The Journal of Neuroscience, 24(5), 1136 -1148.

Chou, Y. C., Lin, W. J., & Sapolsky, R. M. (1994) Glucocorticoids increase extracellular [3H]D-aspartate overflow in hippocampal cultures during cyanide-induced ischemia. *Brain Res*. 654. 8–14.

Comery, T.A., Shah, R., Greenough, W.T. (1995) Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum—evidence for association of morphological plasticity with early response gene-expression. *Neurobiol. Learn. Memory* 63, 217–219.

Conrad, C. D., Ledoux, J. E., Magarinos, A. M. & Mcewen, B. S. (1999) Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of

causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav. Neurosci*. 113, 902–913.

Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J. D. & Melone, M. (1998) EAAC1, a high affinity glutamate transporter, is localized to ast- rocytes and GABAergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. Cereb. Cortex 8, 108–116.

Coppen, A. (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br. J. Psychiatry* 113, 1237–1264.

Cowen, P.J. (1990) A role for 5-HT in the action of antidepressant drugs. *Pharmacol. Ther*. 46, 43–51.

Crino, P. B., Jin, H., Shumate, M. D., Robinson M. B., Coulter D. A. & Brooks-Kayal A. R. (2002) Increased expression of the neuronal glutamate transporter (EAAT3/EAAC1) in hippocampal and neo- cortical epilepsy. *Epilepsia* 43, 211–218.

Cryan J.F. & Holmes A. (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*. 4: 775–790.

Cummings, J. L, Mega, M. S. (2003) Neuropsychiatry and behavior neuroscience. New York: Oxford University Press.

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progr. Neurobiol.*, *65*, 1-105.

Davis, K.E., Straff, D.J., Weinstein, E.A., Bannerman, P.G., Correale, D.M., Rothstein, J.D., Robinson, M.B. (1998) Multiple signalling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. J. Neurosci. 18, 2475–2485.

Daw, N.W., Stein, P.S. & Fox, K (1993) The role of NMDA receptors in information processing. Annu Rev Neurosci 16: 207–222.

Dazzan, P., Soulsby, B., Mechelli, A., Wood, S. J., Velakoulis, D., Phillips, L. J., et al. (2011) Volumetric abnormalities predating the onset of schizophrenia and affective psychosis: an MRI study in subjects at ultrahigh risk of psychosis. Schizophr Bull. Recuperado em 23 de março de 2012, de http://schizophreniabulletin.oxfordjournals.org/content/early/2011/04/25/schbul.sbr035.full.pdf+html

De Oliveira, P.T. & Nanci, A. (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials.25(3):403-13.

De Oliveira, P.T., Zalzal, S.F., Irie, K. & Nanci, A. (2003) Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures.J Histochem Cytochem. 51(5):633-41.

Desilva TM, Billiards SS, Borenstein NS, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC, Rosenberg PA. (2008) Glutamate transporter EAAT2 expression is up-regulated in reactive astrocytes in human periventricular leukomalacia. J Comp Neurol. 10;508(2):238-48.

Deutsch SI, Rosse RB, Schwartz BL, Mastropaolo J. (2001) A Revised Excitotoxic Hypothesis of Schizophrenia: Therapeutic Implications. *Clin Neuropharmacol. 24*(1):43-9.

Domeney, A., & Feldon, J. (1998). The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: How robust is the effect? Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 59, 883-890.

Eastwood S L, McDonald B, Burnet P W J, Kerwin J P R W, Harrison P J (1995) Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. *Mol Brain Res 29*:211-223.

Eastwood S. L., Harrison P. J. (1995) Decreased synaptophysin in the medial temporal lobe in schizophrenia demonstrated using immunoautoradiography. *Neuroscience 69*, 339–343.

Eastwood S.L., Heffernan J., Harrison P.J**. (**1997) Chronic haloperidol treatment differentially affects the expression of synaptic and neuronal plasticity-associated genes. *Mol Psychiatry*. Jul;2(4):322-9.

Eastwood, S. L., & Harrison, P. J. (2005). Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophrenia Research*, *73*, 159-172.

Feinberg I (1990) Cortical pruning and the development of schizo- phrenia. Schizophr Bull 16: 567–570.

Ferdman, N., Murmu, R. P., Bock, J., Braun, K., & Leshem, M. (2007). Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behavioural Brain Research*, *180*, 174-182.

Fone, K. C., & Porkess, M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents — Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*, 1087-1102.

Fournier, K.M., Gonzalez, M.I. & Robinson, M.B. (2004) Rapid trafficking of the neuronal glutamate transporter, EAAC1: evidence for distinct trafficking pathways differentially regulated by protein kinase C and platelet-derived growth factor. J. Biol. Chem. 279 (33), 34505–34513.

Geyer. M A, Wilkinson, L S, Humby T, Robbins T W (1993) Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 34:361-372

Gottesman, I. I. (1991) *Schizophrenia genesis*. New York: Freeman.

Gottlieb M., Domercq M. and Matute C. (2000) Altered expression of the glutamate transporter EAAC1 in neurons and immature oligodendrocytes after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 20, 678–687.

Griffith, J., Cavanaugh, J., Held, J. & Oates, J. (1972) Dextroamphetamine: Evaluation of psychomimetic properties in man. *Archives of General Psychiatry, 26*. 97-100.

Grunewald, M., Menaker, D. and Kanner, B. I. (2002) Cysteine-scanning mutagenesis reveals a conformationally sensitive reentrant pore-loop in the glutamate transporter GLT-1. J. Biol. Chem. 277, 26 074–26 080.

Guillet, B., Lortet, S., Masmejean, F., Samuel D., Nieoullon A. and Pisano P. (2002) Developmental expression and activity of high affinity glutamate transporters in rat cortical primary cultures. Neurochem. Int. 40, 661–671.

Hall F S, Wilkinson L S, Humby T, Inglis W, Kendall D A, Marsden C A, Robbins T W (1998) Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 59:859-872.

Hall, J., Whalley, H.C., Job, D.E., Baig, BJ & McIntosh, A.M., Evans KL, Thomson PA, Porteous DJ, Cunningham-Owens DG, Johnstone EC, Lawrie SM. (2006) A neuregulin 1 variant associated with abnormal cortical function and psychotic symptoms. Nat Neurosci., 9(12):1477-8.

Harrison, P. J. & Law, A. J. (2006) Neuroregulin 1 and schizophrenia: Genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry* 60:132-140.

Harrison, P. J. (2007). Schizophrenia Susceptibility Genes and Neurodevelopment. *Biol Psychiatry*, *61*(editorial), 1119 -1120.

Harrison, P. J., & Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry*, *10*, 40-68.

Harrison, P. J., Law, A. J., & Eastwood, S. L. (2003). Glutamate Receptors and Transporters in the Hippocampus in Schozophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *1003*, 94-101.

Hashimoto, K. (2009) Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Research Reviews*, *61*. 2. 105-123.

Hatch, A., Balazs, T., Wiberg, G. S., & Grice, H. C. (1963). Long-Term Isolation Stress in Rats. *Science, New Series*, *142*(3591).

Haugeto O., Ullensvang K., Levy L. M., Chaudhry F. A., Honore T., Nielsen M., Lehre K. P. and Danbolt N. C. (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers*. J. Biol. Chem.* 271, 27 715–27 722.

Heidbreder, C. A., Weiss, I. C., Domeney, A. M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, .J, Moran, M. C., Nelson P (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100:749-768.

Ho, B.C. & Andreasen, N.C. (2001) Positive symptoms, negative symptoms, and beyond. Current Issues in the Psychopharmacology of Schizophrenia. In: Breier, A., Tran, P.V., Herrera, J.M., Tollefson, G.D., and Bymaster, F.P., Eds. (Lippincott, Williams & Wilkins Healthcare, Philadelphia), pp. 407–416.

Hollmann M and Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci 17: 31–108.

Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR. (2004) Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology*. Dec;47(8):1117-34.

Holmes, D.S. (2001) *Psicologia dos Transtornos Mentais*. Trad. Sandra Costa. 2° ed. Porto Alegre: Artmed.

Hyman, S. (2008). A glimmer of light for neuropsychiatric disorders. *Nature*, *455*(October), 890-893.

Hyman, S., Chisholm, D., Kessler, R., Patel, V., & Whiteford, H. (2006). Mental Disorders. In: M. P. Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, *Disease Control Priorities in Developing Countries* (2nd., pp. 605-625). Washington (DC): World Bank.

Jones G H, Hernandez T D, Kendall D A, Marsden C A, Robbins T W (1992) Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 43:17-35.

Jones GH, Marsden CA, Robbins TW (1991): Behavioural rigidity and rule-learning deficits following isolation rearing in the rat: Neurochemical correlates. *Behav Brain Res* 43:35- 50.

Jong, J. G., Vegt, B. J., Buwalda, B., & Koolhaas, J. M. (2005). Social environment determines the long-term effects of social defeat. Physiology & Behavior, 84, 87 - 95.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*. *Neurology* (4°ed). New York: McGraw-Hill.

Karlsson, R., Heilig, M., & Holmes, A. (2008). Loss of glutamate transporter GLAST (EAAT1) causes locomotor hyperactivity and exaggerated responses to psychotomimetics: rescue by haloperidol and mGlu2/3 agonist. *Biol Psychiatry*, *64*(9), 810-814.

Kim S.M. & Frank L.M. (2009) Hippocampal lesions impair rapid learning of a continuous spatial alternation task. *PLoS One*. 4(5):5494.

Kim, J. W., & Kirkpatrick, B. (1996). Social Isolation in Animal Models of Relevance to Neuropsychiatric Disorders. *Biological Psychiatry*, *40*, 918-922.

Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the Brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews*| *Neuroscience*, *6*(June), 463-475.

Kraeuchi K, Gentsch C, Feer H. (1981) Individually reared rats: alteration in noradrenergic brain functions. *J Neural Transm*.;50(2-4):103-12.

Kubo M. & Ito, E. (2004) Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins.* 15;56(3):411-9.

Kwon, O., Longart, M., Vullhorst, D., Hoffman, D. A., & Buonanno, A. (2005). Neuregulin-1 Reverses Long-Term Potentiation at CA1 Hippocampal Synapses. *Journal of Neuroscience*, *25*(41), 9378 -9383.

Läge D, Egli S, Riedel M, Strauss A, Möller HJ. (2011) Combining the categorical and the dimensional perspective in a diagnostic map of psychotic disorders. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 261(1):3-10.

Lapiz, M.D.S., Mateo, Y., Durkin, S., Parker, T., Marsden, C.A. (2001) Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plusmaze and water maze. *Psychopharmacology* 155, 251–259.

Levenson, J., Weeber, E., Selcher, J.C., Kategaya, L.S., Sweatt, J.D. & Eskin A. (2002) Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake.Nat Neurosci. 5(2):155-61

Lee, Y.A. & Goto, Y. (2011) Chronic stress modulation of prefrontal cortical NMDA receptor expression disrupts limbic structure--prefrontal cortex interaction. Eur.J.Neurosci. 34(3):426-36.

Lehre, K.P. & Danbolt, N.C. (1998) The number of glutamate trans- porter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. J. Neurosci. 18, 8751–8757.

Liddle, P. F., Friston, K. J., Frith, C. D., Hirsch, S. R., Frackowiak, R. J. (1992) The left medial temporal region and schizophrenia. A PET study. J R Soc Med. 85, 224-7

Liguz-Lecznar, M., & Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): The three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Warsaw)*, *67*, 207-218.

Lortet, S., Canolle, B., Masmejean, F., & Nieoullon, A. (2008). Neurochemistry International Plasma membrane expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1 is regulated by glial factors : Evidence for different regulatory pathways associated with neuronal maturation. *Neurochemistry International*, *52*, 1373-1382.

Lowy M. T., Wittenberg L., Yamamoto B. K. (1995) Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. *J Neurochem* 65. 268–274.

Malenka RC (2003) Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann N Y Acad Sci*. 1003:1-11.

Malinow R. & Malenka R.C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 25:103-26.

Maragakis N. J. & Rothstein J. D. (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic diseases. Neurobiol. Dis. 15, 461–473.

Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R. (1990) Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem*, 38(6):837-44.

Masliah E., Alford M., Mallory M., Rockenstein E., Moechars D. and Van Leuven F. (2000) Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. Exp. Neurol. 163, 381–387.

Matute, C., Melone, M., Vallejo-illarramendi, A. & Conti, F (2005). Increased Expression of the Astrocytic Glutamate Transporter GLT-1 in the Prefrontal Cortex of Schizophrenics. *Glia*, *49*, 451- 455.

Meador-Woodruff, J. H., & Healy, D. J. (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Rev*, *31*, 288-294.

Mei, L., & Xiong, W. (2008). Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nature Reviews|Neuroscience*, *9*(June), 437-452.

Miyamoto, S., LaMantia, A. S., Duncan, G. E., Sullivan, P., Gilmore, J. H., Lieberman, J. A., et al. (2003). Recent Advances in the Neurobiology of Schizophrenia. *Recent Avances in Schizophrenia*, *3*(1), 27-39.

Moghaddam B., Bolinao M. L., Stein-Behrens B. & Sapolski, R. (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res*. 655. 251–254.

Nanitsos, E. K., Nguyen, K. T., & Balcar, V. J. (2005). Glutamatergic hypothesis of schizophrenia : involvement of Na + / K + -dependent glutamate transport. *Journal of Biomedical Science*, *12*, 975-984.

Nieoullon, A., Canolle, B., Masmejean, F., Guillet, B., Pisano, P., Lortet, S., et al. (2006). The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse. *J. Neurochem.*, *98*(4), 1007-1018.

Ohnuma, T., Augood, S. J., Arai, H., Mckenna, P. J., & Emson, P. C. (1998). Expression of the human excitatory amino acid transporter 2 and metabotropic glutamate receptors 3 and 5 in the prefrontal cortex from normal individuals and patients with schizophrenia. *Molecular Brain Research*, *56*, 207-217.

Organização Mundial da Saúde. (1997) CID-10 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. 10a rev. São Paulo: Universidade de São Paulo.

Organização Mundial de Saúde – OMS. (2001). The World Health Report 2001. *Mental Health: New Understanding, New Hope* - WHO – Genebra.

Padovan, C. M., Del Bel, E. A., & Guimaraes, F. S. (2000). 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.

Paxinos, G. (1995). The rat nervous system, 2° ed. Australia: Academic Press. 443p.

Paz, R. D., Tardito, S., Atzori, M., & Tseng, K. Y. (2008). Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: From basic neuroscience to clinical psychopharmacology. *European Neuropsychopharmacology*, *18*, 773-786.

Pittenger, C., & Duman, R. S. (2008) Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychobiology*. *33*. 88-109.

Poitry-Yamate, C.L., Vutskits, L. & Rauen, T. (2002) Neuronal-induced and glutamate-dependent activation of glial glutamate transporter function. J. Neurochem. 82, 987–997.

Powell, C.M. & Miyakawa, T. (2006) Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol. Psychiatry 59*, 1198–1207.

Pratt, J. A., Winchester, C., Egerton, A., Cochran, S. M., & Morris, B. J. (2008). Modelling prefrontal cortex deficits in schizophrenia: implications for treatment. *British Journal of Pharmacology*, (January), 465-470.

Rakic, P., Bourgeois, J.P. & Goldman-Rakic, P.S. (1994) Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. Prog Brain Res 102: 227–243.

Rasband, W. (s/d) Image J 1.45s. National Institutes of Health, EUA. Disponível em: http://imagej.nih.gov/ij Acesso em: Fevereiro de 2012

Reagan, L. P., Rosell, D. R., Wood, G. E., Spedding, M., Mun, C., Rothstein, J., et al. (2004) Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: Reversal by tianeptine. *Pnas*, *101*(7), 2179-2184.

Regier D. A., Boyd J. H., Burke J. D., Rae D. S., Myers J. K., Kramer M., et al. (1988). One-month prevalence of mental disorders in the United States. Based on five Epidemiologic Catchment Area sites. A*rchives of General Psychiatry* 45: 977-986.

Reynolds, G. P. & Harte, M. K. (2007). The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, *35*, 433-436.

Rocha, Z. (2001). *Psyché* - Os caminhos do acontecer psíquico na Grécia Antiga. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental,* IV, 2, 67-91.

Rosa M. L., Silva R. C., Moura-de-Carvalho F. T., Brandão M. L., Guimarães F. S., Del Bel E. A. (2005) Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. Braz J Med Biol Res. Nov;38(11):1691-6.

Rosa, M. L. N. M. (2006) Alzheimer's Disease. In: *Neurobiology of Mental Disorders.* Vol.1, p.189-219. Ed.I. New York, Nova Publishers.

Rosa, M. L., Guimarães, F. S., Pearson, R. C., & Del Bel, E. A. (2002) Effects of single or repeated restraint stress on GluR1 and GluR2 flip and flop mRNA expression in the hippocampal formation. *Brain Research Bulletin*, *59*(2), 117-124.

Rosenberg, P.A. & Aizenman, E. (1989) Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. Neurosci Lett 103:162–168.

Rosenberg, P.A., Amin, S. & Leitner, M. (1992) Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. J. Neurosci. 12, 56–61.

Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L.,Wu, D., Nash, N. and Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. Neuron 13, 713–725.

Rothstein, J.D. & Tabakoff, B. (1994) Glial and neuronal glutamate transport following glutamine synthetase inhibition. Biochem Pharmacol. 34:73–79.

Sahakian B. J., Robbins T. W., Iversen S. D. (1977) The effects of isolation rearing in the rat. Anim Learn Behav 5:193-198.

Sanacora, G., Kendell, S. F., Levin, Y., Simen, A. A., Fenton, L. R., Coric, V., *et al*. (2007) Preliminary Evidence of Riluzole Efficacy in Antidepressant-Treated Patients with Residual Depressive Symptoms. *Society of Biological Psychiatry*. *61*. 822- 825.

Sandi, C. (2004) Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Rev. Neurosci.* 5, 917–930.

Sapolsky, R. M. (2000). The Possibility of Neurotoxicity in the Hippocampus in Major Depression: A Primer on Neuron Death. *Society of Biological Psychiatry*, *48*(755-765).

Seeburg P. H., Single F., Kuner T., Higuchi M., Sprengel R.. (2001) Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. Brain Res. 907: 233–243.

Sestito R. S., Trindade L. B., de Souza R. G., Kerbauy L. N., Iyomasa M. M., Rosa M. L.. (2010) Effect of isolation rearing on the expression of AMPA glutamate receptors in the hippocampal formation. *J Psychopharmacol*. (*in press*)

Shen, Y., Tsai, H., Ruan, J., Liao, Y., Chen, S., Chen, C., et al. (2012 ahead of print). Genetic and functional analyses of the gene encoding synaptophysin in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 1-6. Recuperado em 19 de março de 2012, de http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996412000539

Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, et al. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. Science 249: 1580–1585.

Stanford, S. C. (2007) The open Field Test: reinventing the wheel. *Journal of Psychopharmacology*. 21(2):134-135.

Sunanda, M. B. L. & Raju, T. R. (1997) Entorhinal cortex lesioning protects hippocampal CA3 neurons from stress-induced damage. *Brain Res*. 770. 302–306.

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, et al. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science, 276:1699–1702

Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K.., et al. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science. 276:1699–1702

Thorsell, A., Slawecki, C. J., Khoury, A. E., Mathe, A. A., & Ehlers, C. L. (2006). The effects of social isolation on neuropeptide Y levels , exploratory and anxiety-related behaviors in rats. Developmental Psychobiology, 83, 28 - 34.

Varty G. B., Marsden C. A., Higgins G. A. (1999) Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats. Brain Res 824:197-203.

Walsh, R. N & Cummins, R. A. (1976) The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*. 83(3):482-504.

Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, et al. (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. Eur J Neurosci., 10:976–988.

Weiss, I. C., Feldon, J., & Domeney, A. M. (1999). Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: Further evidence for fragility of the response. Behavioural Pharmacology, 10, 139-149.

Weiss, I. C., Iorio, L. D., Feldon, J., & Domeney, A. M. (2000). Strain Differences in the Isolation-Induced Effects on Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Response and on Locomotor Activity. *Behavioral Neuroscience*, *114*(2), 364-373.

Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Rêlo, A. L., Nanz-Bahr, N. I., & Feldon, J. (2004) Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research. 152.* 279-295.

Wiedenmann B. & Franke W. W.. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 41(3):1017-28.

Wiedholz L. M., Owens W. A., Horton R. E., Feyder M., Karlsson R. M., Hefner K., Sprengel R., Celikel T., Daws L. C., Holmes A. (2008) Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and 'schizophrenia-related' behaviors. Mol Psychiatry 13:631-640.

Wilkinson, L.S, Killcross, S.S., Humby, T., Hall, F.S., Geyer, M.A., Robbins, T.W. (1994). Social isolation in the rat produces developmentally specific deficits in prepulse inhibition of the acoustic startle response without disrupting latent inhibition. Neuropsychopharmacology. 10(1):61-72.

Willner, P. (1990) Animal models of depression. *Pharm. Ther. 45.* 425-455.

Yang W. & Kilberg M. S. (2002) Biosynthesis, intracellular targeting and degradation of the EAAC1 glutamate/aspartate transporter in C6 glioma cells. J. Biol. Chem. 277, 38 350–38 357.

Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P. J., & Henn, F. A. (2010) Reduced expression of glutamate transporters vGluT1 , EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats , an animal model of depression. *Neuropharmacology*, 58(2), 465-473.

APÊNDICE

Artigo Original

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA[1]

BEHAVIORAL CHANGES IN EXPERIMENTAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA

Nayanne Beckmann Bosaipo*, Kelly da Silva*, Diego Padovan*, Maria Luiza Nunes Mamede Rosa**, Claudia Maria Padovan***

RESUMO

Ratos criados em isolamento, uma forma de estresse afetivo, a partir do desmame e durante todo o período de desenvolvimento cerebral, têm sido utilizados como um modelo experimental de distúrbios mentais como a esquizofrenia. Diversas evidências demonstraram que o isolamento nestas condições induz alterações comportamentais como hiperatividade em um novo ambiente. Entretanto, em um estudo prévio não observamos essa alteração quando os animais foram testados na arena durante cinco minutos. No presente estudo avaliamos o padrão de exploração e atividade locomotora durante 20 minutos na arena, de ratos criados em isolamento a partir do desmame. Dois grupos de ratos *Wistar* machos foram utilizados: grupo Isolado (1 animal/caixa, n=12) e grupo Controle (3 animais/caixa, n=12). Após dez semanas os ratos foram submetidos ao teste no campo aberto (arena) durante vinte minutos. A criação em isolamento induziu aumento significante do número de cruzamentos na periferia da arena ($F_{1,22}$=14,08; p<0,001) após cinco minutos de teste, enquanto o número de levantamentos foi significantemente reduzido no centro da arena ($F_{1,22}$=12,48; p<0,01). Foi observado também que os animais isolados apresentaram redução significante no tempo despendido no centro da arena ($F_{1,22}$=11,11; p<0,0001) e aumento na periferia da arena ($F_{1,22}$=11,20; p<0,01). Os resultados sugerem que ratos *Wistar* criados em isolamento a partir do desmame devam ser expostos ao novo ambiente por um tempo superior a cinco minutos para apresentarem hiperatividade. Além disso, o padrão de exploração com clara preferência pela periferia da arena apresentado pelos animais isolados pode refletir aspectos emocionais da esquizofrenia em humanos.

Palavras-chave: Isolamento social. Esquizofrenia. Campo aberto. Arena. Hiperatividade.

ABSTRACT

Rats reared in isolation, a kind of affective stress, from weaning and during the period of brain development, have been used as an experimental model of affective disorders like schizophrenia. Several evidence have shown that this isolation condition induces behavioral changes like hyperactivity in a novel environment. However, in a previous study we did not found this alteration when the animals were tested for five minutes in the arena. In this study we evaluate the pattern of locomotor and exploratory activity during twenty minutes in the arena in rats reared in isolation from weaning. Two groups of male Wistar rats were used: Isolated group (1 animal/cage, n=12) and Control group (3 animals/cage, n=12). After 10 weeks all animals were submitted to open field test (arena) for 20 minutes. Isolation rearing induced a significant increase in the number of crossings only at the periphery of the arena ($F_{1,22}$=14,08; p<0,001), that was observed after 5 minutes of test, while the number of rearings was significantly reduced at the center of the arena ($F_{1,22}$=12,48; p<0,01). It was also observed that isolated rats showed a significant reduction on the time spent at the center of the arena ($F_{1,22}$=11,11; p<0,0001) and an increase at the periphery of the arena ($F_{1,22}$=11,20; p<0,01). The results suggest that Wistar rats reared in isolation from weaning should be exposed to a novel environment for a time longer than 5 minutes to present hyperactivity. In addition, the pattern of exploration with a clear preference for the periphery of the arena showed by isolated rats may reflect emotional aspects of the schizophrenia in humans.

Keywords: Social isolation. Schizophrenia. Open field. Arena. Hyperactivity.

[1] Pesquisa realizada na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto-SP. Suporte Financeiro: auxílio Fundação Padre Albino e Bolsas Capes.

* Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP.

** Professora. Doutora na área de concentração em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Pós-doutorado em Neurociência pela Universidade de Sheffield - Inglaterra e pela USP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento (INeC-USP), Ribeirão Preto-SP. Editor Chefe da Revista "Ciência, Pesquisa e Consciência", Revista do curso de Medicina das FIPA. Docente (nível I) do conteúdo de Bioquímica do curso de Medicina das FIPA, Catanduva-SP. Contato: mlrosa.fameca@gmail.com

*** Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP. Membro do Instituto de Neurociência e Comportamento (INeC-USP), Ribeirão Preto-SP.

INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais são doenças que afetam a cognição, a emoção e o comportamento. Com início precoce, frequentemente tendem a se estender cronicamente e assumir um perfil recorrente. Dentre essas doenças, a esquizofrenia é uma síndrome com múltiplos sintomas e tem sido analisada dentro de um modelo que engloba sintomas positivos, negativos, prejuízos cognitivos e sintomas afetivos[1-3].

Os estudos abordando distúrbios psiquiátricos nos últimos 40 anos, com foco nos sistemas cerebrais monoaminérgicos, contribuíram significativamente para a compreensão da patofisiologia destas doenças[4-6]. Desde a metade do século XIX, várias teorias surgiram a respeito das bases neurobiológicas subjacentes à esquizofrenia. As pesquisas se detiveram a implicar inúmeros neurotransmissores e outros componentes neuroquímicos com efeito direto na atividade neuronial. Dentre as teorias, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia foi a que apresentou argumentos mais consistentes e serviu de estímulo para pesquisas posteriores.

Entretanto, nos últimos anos tem sido reconhecida a contribuição de outros sistemas neurotransmissores como o glutamatérgico. Disfunções desse sistema têm sido observadas em uma serie de distúrbios mentais[7]. Considerando a participação do glutamato nos mecanismos cerebrais envolvidos na esquizofrenia, foi demonstrado que uma redução na mediação glutamatérgica pode contribuir para a disfunção cognitiva que ocorre nesta neuropatologia[7-10]. Adicionalmente, têm sido sugerido que as sinapses glutamatérgicas podem ser o sítio das anormalidades primárias que ocorrem nesta doença com as alterações dopaminérgicas sendo secundárias às alterações glutamatérgicas[11]. De acordo com Nieoullon e colaboradores[7], o aprimoramento dos conhecimentos básicos a respeito das sinapses glutamatérgicas poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias direcionadas para reduzir as alterações patológicas associadas com as disfunções desta mediação.

Um grande conjunto de evidências sugere que a esquizofrenia é uma desordem que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Traumas biológicos como doenças ou estresse durante os períodos de desenvolvimento cerebral podem contribuir para explicar os casos de esquizofrenia não associadas à herança genética[12,13].

A utilização de modelos experimentais, principalmente modelos genéticos nos quais genes associados à esquizofrenia são abolidos (*knocked out*), reduzidos (*knocked down*) ou exacerbados (*over-expressed*), fornece evidências de que tais manipulações produzem alterações significativas durante o neurodesenvolvimento[14]. Assim, os modelos experimentais em roedores têm sido amplamente utilizados como ferramentas importantes para o esclarecimento da patofisiologia de doenças psiquiátricas como a esquizofrenia[15-17]. Nesse sentido, os modelos têm auxiliado na identificação de alterações morfológicas, bioquímicas, genéticas e comportamentais relacionadas às patologias e constituem elementos importantes para a compreensão das doenças, além de contribuírem para o aprimoramento dos diagnósticos e para o desenvolvimento de novos tratamentos[18].

Considerando especificamente as alterações comportamentais, em modelos experimentais que utilizam roedores foram identificados comportamentos semelhantes aos sinais e sintomas da esquizofrenia. A agitação psicomotora, caracterizada como atividade locomotora exacerbada e a sensibilidade a drogas psicomiméticas poderiam ser categorizadas como sintomas positivos. Entre os sintomas negativos pode-se citar a retirada social, mensurável como uma redução da interação com animais da mesma espécie. No contexto cognitivo, os fatores identificados foram diminuição da memória de trabalho, déficits de atenção, alterações no registro sensório-motor e em funções executivas, além de déficits cognitivos generalizados[14].

O modelo experimental não farmacológico mais utilizado para o estudo da esquizofrenia é o isolamento social de ratos durante todo o período do desenvolvimento cerebral, que induz alterações semelhantes àquelas que ocorrem no cérebro de humanos esquizofrênicos. Esta similaridade é observada em alterações morfológicas, neuroquímicas e comportamentais, como atrofia dendrítica no estriado[19],

funções dopaminérgica e serotoninérgica aumentadas na área mesolímbica[20-22], hiperatividade em um novo ambiente[23], dificuldade de aprendizado discriminativo[24], déficits na memória de reconhecimento[25], e redução na inibição pelo pré-pulso - PPI[26,27], dentre outras alterações que mostram similaridade aos aspectos clínicos da esquizofrenia[28].

O isolamento social é considerado um estressor afetivo crônico[29,30] e tem sido amplamente empregado como um modelo de esquizofrenia[31,32]. Diversos estudos fornecem dados que dão suporte à utilização da exposição crônica de animais experimentais a um estressor, em condições rigorosamente determinadas, como modelo de depressão e esquizofrenia[32,33]. Demonstrou-se que a exposição de um organismo a um tipo de estressor diariamente durante semanas causa déficits severos na memória hipocampal[34]. Além disso, animais estressados cronicamente mostram alterações do comportamento motivado pelo medo[35]. Pittenger e Duman[36] relacionam os efeitos do estresse também à neuroplasticidade no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e estriado ventral. Ainda, Kloet, Joëls e Holsboer[37] demonstraram correlações anatômicas e neuroquímicas dos déficits comportamentais induzidos por estresse crônico no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, como a remodelação estrutural e proliferação celular, modificações nos sistemas aminérgicos, de neuropeptídeos e corticosteróides. Adicionalmente, os autores sugeriram que a neurotransmissão glutamatérgica seria primordialmente responsável por mediar as alterações neuroniais que ocorrem como consequência destas exposições.

Especificamente, animais submetidos ao estresse por isolamento social durante todo o período de desenvolvimento cerebral apresentam alterações comportamentais e fisiológicas semelhantes à esquizofrenia quando comparados aos animais criados em grupo[31]. Segundo Hatch e colaboradoress[38], ratos isolados por um longo período tornam-se emocionalmente mais reativos e agressivos, além de apresentar uma endocrinopatia com hiperfunção do córtex da glândula adrenal. As observações de Weiss e colaboradores[32] corroboram esses dados, sugerindo que o isolamento social crônico aumenta a reatividade ao estresse e produz um hiperfuncionamento do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) em ratos adultos. O trabalho de revisão de Fone e Porkess[31] sumarizou os efeitos comportamentais provocados pela criação de ratos em isolamento. Dentre eles, o comportamento exploratório, inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso, inibição latente, anedonia, interação social, dor, esquiva passiva, déficits cognitivos, ansiedade, entre outros.

A hiperatividade em um novo ambiente observada em ratos isolados a partir do desmame é uma das alterações comportamentais mais reportadas pelos autores[31,39]. Entretanto, há relatos de autores que não observaram hiperatividade em ratos criados em isolamento a partir do desmame quando testados no campo aberto por cinco minutos[27]. Estes achados foram fidedignamente reproduzidos utilizando outros grupos de animais e outros experimentadores desse mesmo grupo de pesquisadores (resultados não publicados). A discordância destes resultados em relação aos descritos na vasta literatura relacionada é intrigante, especialmente considerando a hiperatividade neste modelo experimental de isolamento social. Os resultados de Rosa e colaboradores[27] foram discutidos por Fone e Porkess[31], os quais sugeriram que a hiperatividade seria observada se os animais fossem mantidos no campo aberto por período superior a cinco minutos.

Outra análise comportamental foi realizada no campo aberto durante 15 minutos, após o mesmo protocolo de isolamento social. Novamente os animais controles (agrupados) e isolados apresentaram igual perfil de atividade exploratória e nenhuma diferença foi observada no decorrer da sessão de teste quando comparações pontuais (minuto a minuto) foram realizadas entre os dois grupos (artigo em preparação). Posteriormente, estudo semelhante avaliou também a atividade exploratória no centro e na periferia da arena, independentemente. Os resultados foram surpreendentes, uma vez que o perfil de exploração observado demonstrou um padrão mais ativo nos animais isolados contrapondo um padrão mais homogêneo nos animais agrupados. As atividades exploratórias, no centro e na periferia da arena, analisadas em cada minuto

reforçaram esta característica, uma vez que os animais isolados apresentaram um comportamento de "vai e vem" entre as duas áreas da arena, enquanto os animais agrupados exploraram uma ou outra área.

Diante do conjunto de evidências apresentado, a proposta deste trabalho foi investigar a hipótese de que ratos *Wistar* isolados durante todo o período do desenvolvimento cerebral apresentam hiperatividade no campo aberto quando testados por tempo mais longo. Adicionalmente, também investigar o padrão desta hiperatividade, se ocorre de forma diferencial na área central ou periférica da arena.

OBJETIVO

Investigar o padrão de atividade exploratória durante 20 minutos no campo aberto (arena) de ratos isolados por 10 semanas a partir do desmame.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 filhotes de ratos *Wistar* machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Ribeirão Preto-SP. Imediatamente após o desmame, os filhotes (21 dias - ±40g) foram separados e divididos aleatoriamente em dois grupos (12 animais/cada): Grupo I (Isolado): alojados em caixas individualmente (um animal/caixa) e Grupo II (Agrupados/controle): alojados em grupos (três animais/caixa).

Todos os animais (isolados e agrupados) foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão (LNED) da FFCLRP-USP, com livre acesso a água e ração, sob ciclo regular claro/escuro (12h/12h), temperatura constante (23ºC ±1) e podendo ver, ouvir e sentir o cheiro dos outros animais.

A duração do isolamento foi de 10 semanas e neste período os animais "isolados" foram manipulados apenas 1x/sem. para limpeza das caixas (troca da maravalha e manutenção de água e ração), enquanto os "agrupados" foram manipulados 3x/sem. O contato do manipulador com o animal não excedia cinco segundos, tempo necessário para pegar o animal pela cauda e trocá-lo de caixa, a fim de evitar que o contato com o manipulador tivesse qualquer interferência nos resultados do trabalho.

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - USP-*campus* Ribeirão Preto-SP. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

Teste no campo aberto

Ao término do período de isolamento os animais, agrupados e isolados, foram submetidos ao teste comportamental para análise da atividade exploratória induzida pela criação em isolamento. O teste foi realizado utilizando uma arena circular (campo aberto) de 75cm de diâmetro, paredes de acrílico de 50cm de altura e com a base dividida em 12 quadrantes de mesma área. Os animais foram colocados no centro da arena e as respostas comportamentais filmadas durante 20 minutos. Os vídeos foram, posteriormente, analisados e os seguintes parâmetros registrados, a cada minuto, durante toda a sessão de teste:

- número de cruzamentos entre qualquer das áreas da base com as quatro patas (*crossings*) - Exploração Horizontal (Atividade Locomotora): este parâmetro foi avaliado separadamente no centro e na periferia da arena.

- tempo despendido no centro e na periferia da arena;

- número de levantamentos do corpo com as patas dianteiras erguidas (*rearings*) - Exploração Vertical: este parâmetro foi avaliado separadamente no centro e na periferia da arena.

Os resultados estão apresentados em blocos de tempo de cinco minutos (BT) e no tempo total de 20 minutos de teste.

Análise estatística

Os resultados obtidos para o grupo controle e isolado foram comparados utilizando ANOVA de medidas repetidas. As diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Padrão de atividade locomotora em ratos criados em isolamento a partir do desmame

A atividade locomotora (exploração horizontal) apresentada pelos dois grupos experimentais, agrupados e isolados, foi intensa nos primeiros minutos seguida de uma redução gradativa até o término da sessão de 20 minutos de teste na arena. Este perfil foi observado tanto no centro como na periferia da arena (Figura 1).

A criação em isolamento induziu aumento significante da atividade locomotora, representada pelo número total de cruzamentos em 20 minutos de teste ($F_{1,22}$=0,38; p<0,05). Este aumento ocorreu apenas na região periférica da arena (73%; $F_{1,22}$= 14,08; p<0,001), enquanto nenhuma diferença foi observada entre os grupos no centro ($F_{1,22}$= 0,13; p>0,05). Esta característica pode ser observada quando o número de cruzamentos na periferia foi comparado entre os grupos em BTs de cinco minutos, e revela que a atividade locomotora dos isolados foi significantemente diferente dos agrupados a partir de cinco minutos de teste (BT2) (BT1: $F_{1,22}$=3,08; p>0,05; BT2: $F_{1,22}$=23,53; p<0,0001; BT3: $F_{1,22}$=20,29; p<0,001; BT4: $F_{1,22}$=5,75; p<0,05).

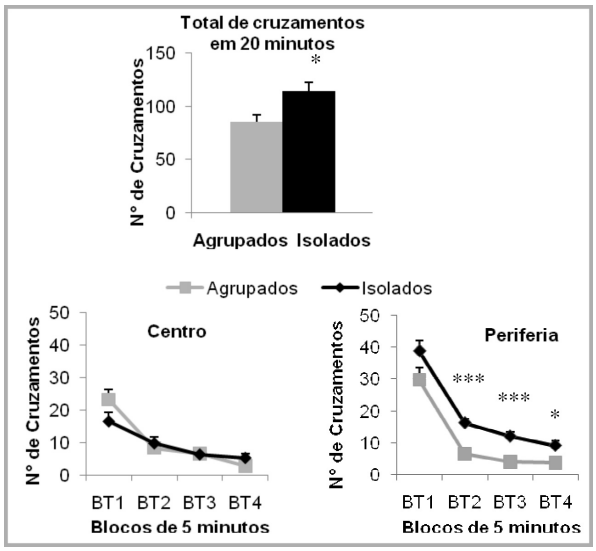

Figura 1 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade locomotora no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias do número de cruzamentos ± EPM durante os 20 minutos de teste (Total de cruzamentos) e em blocos de tempo (BT) de cinco minutos. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001

Padrão de atividade exploratória em ratos criados em isolamento a partir do desmame

Na Figura 2 podemos observar que os animais isolados apresentaram uma discreta, mas significativa redução na atividade exploratória total no campo aberto, demonstrada pelo número de levantamentos nos 20 minutos de teste ($F_{1,22}$=0,27; p=0,05). Entretanto, quando este número foi analisado separadamente no centro ou na periferia, observamos que a redução ocorreu no centro da arena, nos primeiros 15 minutos de teste (58%, $F_{1,22}$=12,48; p<0,01), sendo significante em relação aos animais agrupados no BT1 ($F_{1,22}$=14,95; p<0,001) e BT3 ($F_{1,22}$= 7,54; p<0,05). Em contraste, na periferia do campo aberto os animais isolados apresentaram aumento significativo no número de levantamentos no segundo e terceiro BT ($F_{1,22}$=; p<0,05).

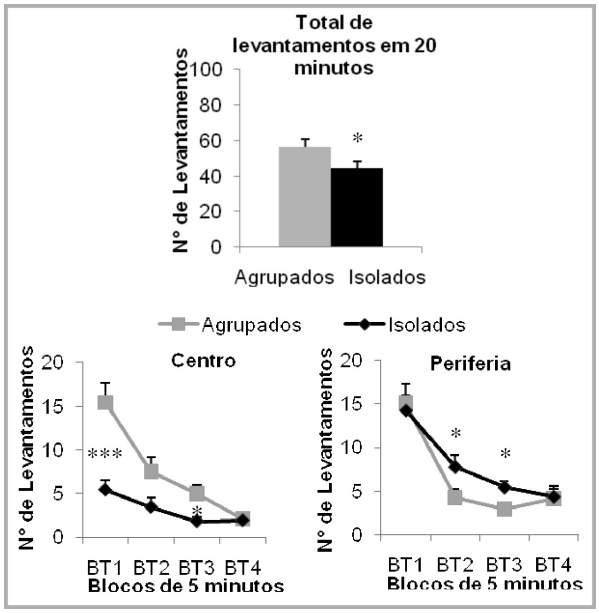

Figura 2 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a atividade exploratória no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias do número de levantamentos ± EPM durante os 20 minutos de teste (Total de levantamentos) e em blocos de tempo (BT) de cinco minutos. *p≤ 0,05; **p≤ 0,01; ***p≤ 0,001

Tempo de permanência no centro e na periferia da arena em ratos criados em isolamento a partir do desmame

A análise do tempo despendido em cada região da arena durante os 20 minutos de teste demonstrou que o isolamento induziu uma redução significativa do tempo despendido no centro da arena (54%, p=0,003) quando estes animais foram comparados aos controles agrupados. Esta redução foi observada em todos os BTs ao longo dos 20 minutos de teste ($F_{1,22}$=11,11; p<0,001). Como esperado, o inverso foi observado em

relação ao tempo despendido na periferia da arena, onde os animais criados em isolamento apresentaram aumento significativo em relação aos controles (65%, p=0,003) em todos os BTs analisados ($F_{1,22}$=11,20; p<0,01).

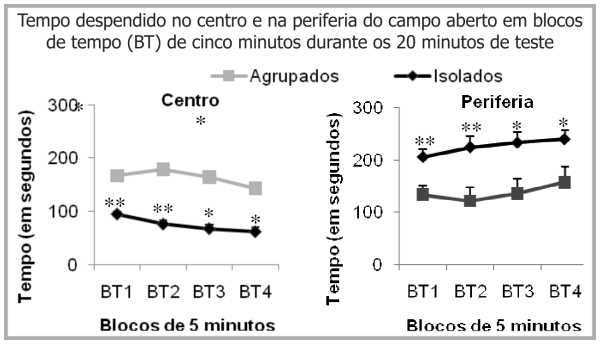

Figura 3 - Efeito da criação em isolamento a partir do desmame sobre a o tempo de permanência no centro e na periferia da arena. Estão representadas as médias ±EPM do tempo de permanência em cada região da arena durante os 20 minutos de teste, avaliados em blocos de tempo (BT) de cinco minutos. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001

DISCUSSÃO

Inúmeros estudos utilizam o isolamento social de ratos durante 8 a 10 semanas após o desmame, período do desenvolvimento cerebral, como modelo experimental para estudar doenças psiquiátricas como a esquizofrenia[32,33,40,41]. Estes estudos têm demonstrado que este modelo experimental produz uma série de alterações comportamentais duradouras e reproduzíveis nos animais na idade adulta.

No presente trabalho avaliamos a atividade locomotora de ratos submetidos ao isolamento com o foco voltado para o perfil de exploração apresentado por esses animais em comparação com aqueles criados em grupo. Nossos resultados mostraram diferenças na atividade exploratória horizontal (atividade locomotora) no campo aberto como um todo e principalmente na periferia, enquanto as diferenças na frequência de levantamentos (exploração vertical) ocorreram no centro da arena. A hiperatividade locomotora, uma característica comportamental descrita para este modelo experimental, foi observada em nosso estudo e está de acordo com diversos achados da literatura a partir de estudos semelhantes[31,32,42]. Este achado corrobora a ideia de que a hiperatividade observada no campo aberto é um dos efeitos clássicos do isolamento social quando aplicado na fase de desenvolvimento cerebral.

Apesar da consistência e qualidade dos experimentos que embasam essa tese, vários autores não puderam observar os mesmos resultados[27,40]. A discrepância entre eles é intrigante se comparados com a vasta literatura relacionada especificamente à hiperlocomoção utilizando o modelo do isolamento social. Assim, vários aspectos devem ser discutidos a respeito das diferenças encontradas entre os estudos experimentais.

Considerando inúmeras discussões na literatura, diferentes resultados obtidos a partir de testes comportamentais podem ser influenciados por um conjunto de fatores relacionados às características específicas de cada condição experimental. Sendo assim, a discordância entre os estudos citados poderia ser explicada por fatores que podem variar entre os laboratórios de pesquisa como a linhagem dos animais, os protocolos de manipulação, as condições do ambiente de isolamento, a sensibilidade ao ambiente de teste, ao teste comportamental em si e ao aparato utilizado, entre outros fatores, que podem ser decisivos na reprodução dos efeitos do isolamento.

Walsh e Cummins[43] revisaram em detalhes as diversas variáveis envolvidas no teste de animais no campo aberto e suas influências, além dos métodos de análise e interpretação dos resultados. Segundo esses autores, fatores genéticos e o *background* da experiência exercem efeitos diferenciais nos animais que culminam em manifestações comportamentais no teste do campo aberto. O trabalho discute, por exemplo, que características físicas do aparato como o tamanho, a cor, a forma, a subdivisão, a altura da parede, a textura do chão, o odor, a natureza e a localização da área de início, variam entre os estudos que utilizam o teste no campo aberto. Além disso, o ambiente circundante onde o teste é realizado é diversificado, com variações que incluem a natureza, a intensidade e a posição da luz, fontes de som e de odores, além da visibilidade e posição do observador. O mesmo ocorre com diversos detalhes do procedimento e das características individuais de observação de cada experimentador. Assim, ainda que tenham sido estabelecidas padronizações dentro de cada laboratório, não há uniformidade nos procedimentos e

resultados encontrados na literatura como um todo. De acordo com Walsh e Cummins[43], isso ocorre porque poucos trabalhos citam, além das informações sucintas do método, detalhes dos materiais e procedimentos específicos utilizados. Este aspecto tem importância fundamental, uma vez que a grande diversidade de protocolos experimentais existentes torna difícil a comparação entre os estudos e, em alguns casos, estes são impossíveis de interpretar[44]. Outro aspecto desta diversidade é a dificuldade de reproduzir os achados descritos na literatura.

Devido a estas considerações encontramos dificuldades em comparar nossos resultados com aqueles da literatura. Estas foram feitas em relação a trabalhos que utilizaram protocolos experimentais semelhantes, embora encontremos entre eles variações com relação ao tempo de exposição ao novo ambiente, à luz utilizada no teste, aos parâmetros observados e à linhagem de animais utilizada.

Considerando o tempo de exposição ao novo ambiente, Fone e Porkess[31] sugeriram que a hiperatividade locomotora poderia ter sido observada se os animais fossem expostos ao ambiente por um período mais longo, suficiente para registrar um perfil temporal. Nossos resultados corroboraram essa ideia quando observamos diferenças na atividade locomotora entre os grupos apenas a partir do segundo bloco de tempo, ou seja, após cinco minutos de teste. Nossos achados sugerem que ratos da linhagem *Wistar* necessitam ser expostos ao ambiente novo por um tempo mais longo que os cinco minutos para que a hiperatividade locomotora possa ser registrada.

Considerando a linhagem, Fone e Porkness[31] discutem que as alterações comportamentais reportadas nos trabalhos da literatura só são reprodutíveis quando o isolamento social é aplicado à mesma linhagem de ratos. Dessa forma, ainda que duas linhagens diferentes sejam submetidas rigorosamente ao mesmo protocolo de isolamento e teste, as respostas comportamentais podem ser mais marcantes ou mesmo opostas. Weiss e colaboradores[42], em experimentos com as linhagens *Lister hooded*, *Wistar* e *Sprague-Dawley*, observaram que diferenças na sensibilidade aos estímulos refletiam na atividade locomotora. Este estudo comparou o comportamento destes animais, após o isolamento, durante 60 minutos no campo aberto. Uma vez que em nosso estudo a duração do teste foi de 20 minutos, nossos resultados podem ser comparados aos resultados obtidos na primeira etapa do experimento de Weiss. Entretanto, os autores registraram a atividade locomotora total nos 60 minutos de teste, não sendo possível concluir se a hiperatividade observada ocorreu uniformemente ao longo de todo o período ou em algum momento específico. Esta observação somente poderia ser feita se os resultados tivessem sido apresentados em blocos de menor tempo.

Arakawa[40] também utilizou a linhagem *Wistar* e não observou hiperatividade locomotora nos animais criados em isolamento. Como mencionado anteriormente, este efeito também não foi observado em nosso laboratório nos experimentos em que os animais foram testados no campo aberto por cinco minutos. Outra característica semelhante entre nossos achados e os de Arakawa foi o padrão mais ativo do comportamento exploratório dos animais isolados relatado pelo autor, também representado por um número maior de entradas no centro da arena em relação aos animais agrupados, embora não tenham sido observadas diferenças significativas.

Após a realização de quatro experimentos independentes utilizando a linhagem de ratos *Wistar* obtivemos resultados que, embora não estejam de acordo com a literatura, são consistentes (artigos em preparação). Observações semelhantes relacionadas às diferentes linhagens foram descritas por outros pesquisadores que estudaram o déficit de atenção no PPI[27,39,45]. Estas características sugerem que ratos da linhagem *Wistar* criados em isolamento a partir do desmame podem ser mais resistentes em desenvolver a sensibilidade a estímulos necessária para induzir respostas comportamentais de hiperatividade e déficit de atenção. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que o protocolo experimental e os parâmetros empregados para análise neste estudo não tenham sido adequados para detectar estas diferenças.

Os resultados significantes entre os grupos experimentais encontrados aqui só foram visíveis porque os comportamentos foram analisados de forma independente na periferia e no centro da arena. Considerando o número de levantamentos (atividade exploratória), os animais isolados apresentaram diferença significante em relação aos agrupados apenas no centro da arena. Entretanto, ao analisar estes dados em conjunto com os encontrados na periferia, a diferença entre os grupos não foi significante. A análise realizada separadamente permitiu ainda observar que os ratos criados em isolamento permaneceram a maior parte do tempo do teste na periferia da arena, refletindo efeito ansiogênico do isolamento. Adicionalmente, estes achados permitem ainda estabelecer relações com os sintomas negativos da esquizofrenia, os quais estão associados à diminuição ou perda das funções normais como embotamento afetivo, restrições na fluência de raciocínio, anedonia (inabilidade em experimentar prazer), retraimento social, diminuição da motivação e da iniciativa.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram os dados da literatura no sentido de que ratos mantidos em isolamento a partir do desmame e durante todo o período do desenvolvimento cerebral apresentam hiperatividade em ambiente novo (campo aberto ou arena). Entretanto, sugerem que ratos da linhagem *Wistar* criados nestas condições são mais resistentes a desenvolverem este comportamento e devem ser expostos ao ambiente por um período mais longo para que a hiperatividade possa ser detectada. Adicionalmente, os resultados sugerem que o isolamento de ratos desta linhagem apresenta um padrão de exploração com uma clara preferência pela periferia da arena. Assim, a análise separada deste comportamento na periferia e no centro da arena deve ser considerada quando ratos *Wistar* forem utilizados neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS

1. Andreasen NC. Negative symptoms in schizophrenia: definition and reliability. Arch Gen Psychiatry. 1982; 39:784-8.
2. Ho BC, Andreasen NC. Positive symptoms, negative symptoms, and beyond. Current issues in the psychopharmacology of schizophrenia. In: Breier A, Tran PV, Herrera JM, Tollefson GD, Bymaster FP, editors. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 407-16.
3. Läge D, Egli S, Riedel M, Strauss A, Möller HJ. Combining the categorical and the dimensional perspective in a diagnostic map of psychotic disorders. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2011; 261(1):3-10.
4. Coppen A. The biochemistry of affective disorders. Br. J. Psychiatry. 1967; 113:1237-64.
5. Cowen PJ. A role for 5-HT in the action of antidepressant drugs. Pharmacol Ther. 1990; 46:43-51.
6. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nature Rev Neurosci. 2006; 7:137-51.
7. Nieoullon A, Canolle B, Masmejean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S, et al. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse. J. Neurochem. 2006; 98(4):1007-18.
8. Pratt JA, Winchester C, Egerton A, Cochran SM, Morris BJ. Modelling prefrontal cortex deficits in schizophrenia: implications for treatment. Br J Pharmacol. 2008; 153 Suppl 1:S465-70.
9. Nanitsos EK, Nguyen KT, Balcar VJ. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na + / K + -dependent glutamate transport. J Biomedical Science. 2005; 12:975-84.
10. Bauer D, Haroutunian V, Meador-woodruff JH, Mccullumsmith RE. Abnormal glycosylation of EAAT1 and EAAT2 in prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. Schizophr Res. 2010; 117:92-8.
11. Carlsson M, Carlsson A. Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? Schizophr Bull. 16:425-32.
12. Holmes DS. Psicologia dos transtornos mentais. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
13. Miyamoto S, La Mantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA, et al. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. Mol Interv. 2003; 3(1):27-39.
14. Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? Biol. Psychiatry. 2006; 59:1198-207.
15. Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov. 2005; 4:775-90.
16. Seeburg PH, Single F, Kuner T, Higuchi M, Sprengel R. Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. Brain Res. 2001; 907:233-43.
17. Holmes A, Lachowicz JE, Sibley DR. Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. Neuropharmacol. 2004; 47(8):1117-34.
18. Hyman S, Chisholm D, Kessler R, Patel V, Whiteford H. Mental disorders. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editores. Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd ed. Washington (DC): World Bank; 2001. p. 605-25.
19. Comery TA, Shah R, Greenough WT. Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum-evidence for association of morphological plasticity with early response gene-expression. Neurobiol Learn Memory. 1995; 63:217-9.
20. Jones GH, Hernandez TD, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. Pharmacol Biochem Behav. 1992; 43:17-35.
21. Bardgett ME, Jackson JL, Taylor BM, Csernansky JG. The effects of kainic acid lesions on locomotor responses to haloperidol and clozapine. Psychopharmacol. 1998; 135(3):270-8.
22. Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Inglis W, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in

striatal dopaminergic systems. Pharmacol Biochem Behav. 1998; 59:859-72.

23. Sahakian BJ, Robbins TW, Iversen SD. The effects of isolation rearing in the rat. Anim Learn Behav. 1977; 5:193-8.
24. Jones GH, Marsden CA, Robbins TW. Behavioural rigidity and rule-learning deficits following isolation rearing in the rat: Neurochemical correlates. Behav Brain Res. 1991; 43:35-50.
25. Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA, et al. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. European J Neuroscience. 2006; 24:2894-902.
26. Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW. Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. Biol Psychiatry. 1993; 34:361-72.
27. Rosa ML, Silva RC, Moura-de-Carvalho FT, Brandão ML, Guimarães FS, Del Bel EA. Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition. Braz J Med Biol Res. 2005; 38(11):1691-6.
28. Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. Psychophysiol. 1978; 15:339-43.
29. Kraeuchi K, Gentsch C, Feer H. Individually reared rats: alteration in noradrenergic brain functions. J Neural Transm. 1981; 50(2-4):103-12.
30. Blanchard RJ, Mckittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. Physiology & Behavior. 2001; 73:261-71.
31. Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents - Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev. 2008; 32(6):1087-102.
32. Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Rêlo AL, Nanz-Bahr N I, Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. Behav Bra Res. 2004; 152:279-95.
33. Kim JW, Kirkpatrick B. Social isolation in animal models of relevance to neuropsychiatric disorders. Biological Psychiatry. 1996; 40:918-22.
34. Sandi C. Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. Nature Rev. Neurosci. 2004; 5:917-30.
35. Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, Mcewen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. Behav. Neurosci. 1999; 113:902-13.
36. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. Neuropsychobiol. 2008; 33:88-109.
37. Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nature Reviews, Neuroscience. 2005; 6:463-75.
38. Hatch A, Balazs T, Wiberg GS, Grice HC. Long-term isolation stress in rats. Science, New Series. 1963; 142(3591):507.
39. Domeney A, Feldon J. The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect? Pharmacol Biochem Behav. 1998; 59(4):883-90.
40. Arakawa H. The effect of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. Dev Psychobiol. 2003; 43:11-9.
41. Reynolds GP, Harte MK. The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. Biochemical Society Transactions. 2007; 35:433-6.
42. Weiss IC, Iorio LD, Feldon J, Domeney AM. Strain differences in the isolation-induced effects on prepulse inhibition of the acoustic startle response and on locomotor activity. Behav Neurosci. 2000; 114(2):364-73.
43. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. Psychological Bulletin. 1976; 83(3):482-504.
44. Stanford SC. The open field test: reinventing the wheel. J Psychopharmacol. 2007; 21(2):134-5.
45. Weiss IC, Feldon J, Domeney AM. Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. Behav Pharmacol. 1999; 10:139-49.