UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

JEAN FELIPE MARQUES

Papel dos receptores de glutamato do tipo NMDA localizados no Núcleo Mediano da Rafe na expressão do desamparo aprendido em ratos.

RIBEIRÃO PRETO
2015

JEAN FELIPE MARQUES

Papel dos receptores de glutamato do tipo NMDA localizados no Núcleo Mediano da Rafe na expressão do desamparo aprendido em ratos.

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

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

RIBEIRÃO PRETO
2015

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de documentação da FFCLRP-USP
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Marques, Jean Felipe

Papel dos receptores de glutamato do tipo NMDA localizados no Núcleo Mediano da Rafe na expressão do desamparo aprendido em ratos. / Jean Felipe Marques; Orientadora Cláudia Maria Padovan. – Ribeirão Preto, 2015.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2015.

1. Desamparo aprendido 2. Receptores NMDA 3. Glutamato 4. Núcleo Mediano da Rafe

Nome: MARQUES, Jean Felipe

Título: Papel dos receptores de glutamato do tipo NMDA localizados no Núcleo Mediano da Rafe na expressão do desamparo aprendido em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de registrar o meu profundo sentimento de gratidão aos animais que, sem os mesmos, não seria possível realizar esta pesquisa.

À Profa Dra Cláudia Maria Padovan pela disponibilidade em seu laboratório, pela enorme contribuição científica e intelectual e, principalmente, pela paciência. Claro, sem esquecer as conversas de nossos “*coffee/tea breaks*” dentre os quais, mesmo com conversas não necessariamente acadêmicas, aprendi muito. Muito obrigado Claudinha!

Ao Prof. Dr Manoel Jorge Nobre do E. Santo que, com muito profissionalismo, contribuiu enormemente com o meu aprendizado durante o mestrado, além da disponibilidade do uso do criostato e das boas conversas.

À Adriana pela amizade e aprendizado não formal e formal das nossas intensas conversas e discussões sobre ciência, educação e tudo mais.

À Renata e ao Igor pelos imensos apoios durante este curso de mestrado.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurobiologia e Depressão e do laboratório do Prof. Dr. Carlos R. Tirapelli pelo ótimo convívio e aprendizado durante esse tempo de mestrado.

À todos os meus professores desde a pré-escola até a pós-graduação os quais contribuíram para que eu chegasse até aqui. Em especial a Profa Dra Cláudia Helena Pellizzon (orientadora da minha iniciação científica) que foi fundamental para que me instigasse à ciência e a busca pela neurociência.

À minha família: tios, avós, à minha irmã, meu pai e meus sobrinhos pelo apoio e acolhimento fundamentais na minha jornada neste plano terreno. Em especial minha mãe Teresa que desde minha existência em seu ventre, nunca me desamparou, nem mesmo à distância.

À Daniela Vitti R. da Silva pelo amor e paixão que compartilhamos um pelo outro e pelas infinitas discussões sobre ciência e tudo mais, à nossa amizade e pela possibilidade de me tornar uma pessoa mais completa ao seu lado.

Aos meus amigos de república (K-zona) que em nossa tábua regada a café, *history channel*, comida e discussões acadêmicas possibilitaram a expansão da mente por meio das ideias.

Aos meus colegas da psicobiologia e meus novos amigos Rafael Vasques e Matheus pelas conversas e discussões acadêmicas e afins.

À CAPES pelo apoio financeiro fundamental para essa pesquisa e minha formação.

À FFCLRP, à USP e ao Programa de pós-graduação em Psicobiologia pela oportunidade de realizar esse trabalho bem como a possibilidade de mais uma etapa na minha formação acadêmica.

“[...] Na verdade havia no planeta uma única espécie mais inteligente que os golfinhos, que passava boa parte do seu tempo nos laboratórios de pesquisas de comportamento, correndo atrás de rodas e realizando experiências incrivelmente elegantes e sutis com seres humanos. [...]

Arthur pensou nisso por um segundo [...] Ah, não – disse ele – [...] o que acontecia é que nós é que fazíamos experimentos com eles. [...] com base nas observações do comportamento deles, a gente aprendia um monte de coisas a respeito do nosso comportamento...

A voz de Arthur foi morrendo aos poucos.”

DOUGLAS ADAMS

Autor de - O guia do mochileiro das galáxias -

MARQUES, J. F., PADOVAN, C. M. Papel dos receptores de glutamato do tipo NMDA localizados no Núcleo Mediano da Rafe na expressão do desamparo aprendido em ratos.

2014. 70 folhas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

O estresse sido relacionado às causas de diferentes transtornos psiquiátricos, como os transtornos de humor. Dentre os modelos utilizados no estudo da neurobiologia da depressão e que empregam a exposição a agentes estressores, o desamparo aprendido tem sido bastante empregado. Nesse sentido, a adaptação ao estresse parece envolver um fortalecimento da neurotransmissão serotoninérgica do Hipocampo Dorsal (HD) ou do Núcleo Mediano da Rafe (NMnR), estruturas essas anatômica e funcionalmente vinculadas. O HD recebe projeções serotoninérgicas oriundas do NMnR, onde também estão localizados receptores de glutamato de tipo NMDA (NMDAr), os quais controlam a liberação de serotonina no HD e também no próprio NMnR. Entretanto, ainda não se sabe qual o papel dos NMDA na adaptação ao estresse. Assim, o objetivo desse trabalho é investigar se as ativações dos NMDAr do NMnR são capazes de prevenir ou atenuar os efeitos da exposição a choques elétricos inescapáveis. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar com cânula guia direcionada ao NMnR e submetidos ao desamparo aprendido. Os animais foram divididos de acordo com o tratamento farmacológico (injeções intracerebrais - i.c.) com salina, AP7 e/ou NMDA, combinadas de forma a compor os seguintes grupos: salina + salina, AP7 + salina, salina + NMDA e AP7 + NMDA. O tratamento intracerebral foi realizado imediatamente antes (inj + CI → CE; Estudo 1) ou depois (CI + inj → CE; Estudo 2) da exposição a choques inescapáveis nas patas (CI). Após 24h os animais foram submetidos a choques escapáveis sinalizados (CEs) por uma luz. O grupo controle do estudo (inj → CE; Estudo 3) recebeu os diferentes tratamentos i.c. e foi testado 24h depois. As respostas de esquiva, fuga, falha bem como as latências de respostas e cruzamentos foram registradas e agrupadas em blocos de cinco respostas consecutivas (BT). Os dados dos animais que tiveram sítio de injeção confirmado, após análise histológica, foram analisados estatisticamente utilizando-se MANOVA de medidas repetidas com *post hoc* de Bonferroni. Foi considerado como significativo o valor de $p < 0,05$. O tratamento antes da pré-exposição com AP7 + NMDA aumentou o número de esquivas, diminuindo a latência para essas respostas. Quando o tratamento com AP7 e/ou NMDA foi realizado imediatamente após a pré-exposição, não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle (salina + salina). Não foram observadas diferenças entre os grupos na condição controle. Os dados mostram que o bloqueio da neurotransmissão mediada por NMDA no NMnR previne os efeitos da exposição prévia a um estressor, sugerindo que a ativação destes receptores é importante para a aquisição das memórias relacionadas ao episódio estressante.

Palavras-chave: desamparo aprendido, NMDA, glutamato, Núcleo Mediano da Rafe.

ABSTRACT

MARQUES, J. F., PADOVAN, C. M. **Role of NMDA-type glutamate receptors localized in the Raphe Median Nucleus in learned helplessness expression in rats.** 2014. 70 f. Thesis (Master) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015

Exposure to stressful situations has been related to different psychiatric diseases, such as mood disorders. Learned helplessness has been widely used to investigate the neurobiology of depression among the animal models that involve exposure to uncontrollable aversive stimuli, learned. In this sense, it seems adaptation to the stressful conditions involves an increase in serotonergic neurotransmission within the dorsal Hippocampus (dH) or Median Raphe Nucleus (MnRN), which are interrelated. The dH receives serotonergic projections from the MnRN which, in turn, also has NMDA-type glutamate receptors (NMDAr). These NMDAr regulate serotonin release in the dH and also within the MnRN itself. However, the role of MnRN NMDAr it is not known in the development of tolerance to stress. Therefore, the aim of this work was to investigate if MnRN NMDAr activation can prevent and/or attenuate the behavioural effects of exposure to inescapable electric footshocks. Male wistar rats with guided cannulas aimed to the MnRN were submitted to the learned helplessness model. Animals were divided into groups according to the pharmacological treatment (intracerebral injections) they received of Saline, AP7 (NMDAr antagonist) and/or NMDA (NMDAr agonist) as follows: saline + saline, AP7 + saline, saline + NMDA or AP7 + NMDA. Intracerebral treatment was performed immediately before (inj + Ifs → SEFs) or after (Ifs + inj → SEFs) exposure to inescapable footshocks (IFs). Twenty-four hours later rats were tested and received light-signalized escapable footshocks (SEFs). In an additional control condition, rats received the intracerebral treatment 24 h before test, but were not pre-exposed to IFs (inj → SEFs). Avoidance, fight, failure and latency to these responses were registered and presented in blocks of five consecutive *trials*. Data of animals with confirmed brain site injections were analyzed by repeated measures MANOVA followed by Bonferroni post hoc test. Significance was considered for $p < 0,05$. Pre-exposure treatment with AP7 + NMDA increased number of avoidance responses, decreasing latency to response. When treated with AP7 and/or NMDA immediately after exposure to IFs, no differences were observed when compared to control rats. Also, no differences between groups were detected in control condition, when rats were treated 24 h before test with SEFs. Our data shows that blockade of NMDAr prevents development of behavioral consequences of stress, suggesting that activation of these receptors are important for the acquisition of stressful memories.

Keywords: Learned helplessness, NMDA, glutamate, Median Raphe Nucleus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do ciclo de estímulos em CI	40
Figura 2 – Representação do ciclo de estímulos em CE.....	41
Figura 3 – Representação do sítio de injeção no núcleo mediano da Rafe (NMnR).....	43
Figura 4 - Agrupamento das variáveis dependentes em BTs durante uma seção experimental de 30 <i>trials</i> de C.E.	44
Figura 5 - Efeito dos tratamentos sobre as respostas dos animais no estudo 1.	50
Figura 6 - Efeito dos tratamentos sobre os cruzamento e latência dos animais no estudo 1....	51
Figura 7 - Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido no estudo 1....	52
Figura 8 - Efeito dos tratamentos sobre as respostas dos animais no estudo 2.	55
Figura 9 - Efeito dos tratamentos sobre os cruzamento e latência dos animais no estudo 2....	56
Figura 10 - Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido no estudo 2..	57
Figura 11 – Efeito dos tratamentos sobre as respostas dos animais no estudo 3.....	59
Figura 12 - Efeito dos tratamentos sobre os cruzamento e latência dos animais no estudo 3.	60
Figura 13 - Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido no estudo 3..	61

LISTA DE ABREVIATURAS

E SIGLAS

5-HT – serotonina

a.C. – antes de Cristo

ADT – antidepressivo tricíclico

AP7 – antagonista competitivo de receptor NMDA

Ca⁺⁺ - cálcio

CE – choques elétricos escapáveis sinalizados

CI – choques elétricos inescapáveis

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CID-10 - Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento

DA – desamparo aprendido

DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais IV

FFCLRP – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto

GABA – ácido-gama-aminobutírico

HD – hipocampo dorsal

i.c. – intra cerebral

i.m. – intra muscular

inj - injeção

i.p. – intra peritoneal

IMAO – inibidores de monoaminoxidase

ISRS – inibidores seletivos de receptação de serotonina

LCE – labirinto de cruz elevado

LNED – Laboratório de Neurobiologia e Depressão

LTD – depressão a longo termo (sigla em inglês)

LTP – potenciação a longo termo (sigla em inglês)

MAO – enzima monoaminoxidase

NA – noradrenalina

Na⁺ - sódio

NDR – núcleo dorsal da rafe

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMnR – núcleo mediano da rafe

NO – óxido nítrico

PBS – tampão fosfato

q.s.p – quantidade suficiente para

s.c. – subcutânea

S.E. – sem choque elétrico

SNC – sistema nervoso central

UI – unidade internacional

USA – United States of America (Estados Unidos da América)

USP – Universidade de São Paulo

USP-RP – Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto

BT – bloco de resposta

%DA – porcentagem de desamparo aprendido

EPM – erro padrão da média

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

± - mais ou menos

® - marca registrada

μL – microlitro

μm - micrômetro

cm – centímetro

g – gramas

h – hora

kg – kilograma

mA – miliAmpère

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

nmol – nanomol

° - graus

°C – graus Célsius

pH – potencial hidrogeniônico

s - segundo

W – Watts

≥ - maior ou igual

< - menor

> - maior

χ² - Qui quadrado

gl – grau de liberdade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. O Transtorno Depressivo	23
1.2. Tratamentos Farmacológicos dos Transtornos Depressivos	24
1.3. Desamparo Aprendido	26
1.4. Núcleo Mediano da Rafe (NMnR)	27
1.5. Glutamato	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Sujeito experimental	34
3.2. Fármacos e insumos	34
3.3. Equipamentos e demais materiais utilizados	35
3.4. Procedimentos	36
3.4.1. Estudo 1: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente antes da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido.	37
3.4.1.1. Cirurgia estereotáxica	37
3.4.1.2. Tratamentos farmacológicos	39
3.4.1.3. Choques elétricos inescapáveis (CI)	40
3.4.1.4. Choque escapável sinalizado (CE)	41
3.4.1.5. Perfusão	42
3.4.1.6. Análise histológica	42
3.4.1.7. Análise de dados	43
3.4.1.8. Análise estatística	45
3.4.2. Estudo 2: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente após da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido	46
3.4.3. Estudo 3: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA em ratos que não foram submetidos aos choques elétricos inescapáveis	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

4.1.	Estudo 1: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente antes da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido	49
4.1.1.	Discussão do Estudo 1.....	52
4.2.	Estudo 2: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente após da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido	54
4.2.1.	Discussão do Estudo 2.....	57
4.3.	Estudo 3: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA em ratos que não foram submetidos aos choques elétricos inescapáveis	58
4.3.1.	Discussão do Estudo 3.....	61
4.4.	Manova Geral.....	62
4.4.1.	Discussão geral	63
5.	<i>CONCLUSÃO</i>	64
6.	<i>REFERÊNCIAS</i>	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Transtorno Depressivo

A depressão é correlacionada, por muitos autores, com a organização social, econômica e política do tempo atual, o qual é conhecido como a “era das depressões” (ANTÔNIO; TEIXEIRA, 2005). Muitos estudos vêm sendo feitos sobre a depressão devido a sua comparação com o estilo de vida da pós-modernidade, mas essa forma de sofrimento psíquico já existia há muito tempo (ANTÔNIO; TEIXEIRA, 2005). A depressão já era descrita como patologia de humor desde a Grécia antiga, porém era chamada de melancolia e foi descrita por Hipócrates (460 – 377 a.C.) “como um estado de tristeza e medo de longa duração” (ANTÔNIO; TEIXEIRA, 2005). O termo “melancolia” foi substituído pelo termo “depressão”, pois o primeiro termo remetia à literatura romântica e, portanto, era inadequado à ciência psiquiátrica que se desenvolvia no século XIX (ANTÔNIO; TEIXEIRA, 2005).

Hoje em dia, a depressão é definida como um “transtorno”, baseado nos resultados de estudos colaborativos da psicobiologia da depressão entre o projeto de diagnóstico dos Estados Unidos-Reino Unido e o Instituto Nacional de Doenças Mentais. Tal definição pode ser encontrada no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais IV(DSM-IV) e na Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento (CID-10) (WONG; LICINIO, 2001).

Os episódios depressivos podem apresentar sintomas recorrentes e podem durar de meses a anos. Tais episódios refletem-se na economia por se traduzirem na redução da capacidade de trabalho das pessoas e também na possibilidade de que os episódios depressivos possam se iniciar em jovens e, com isso, refletir na redução da capacidade produtiva, em termos de anos perdidos (M. MARCUS, M.T. YASAMY, M. OMMEREN, D. CHISHOLM, 2012; MOREIRA; FORTALEZA, 2008; PATEL; KLEINMAN, 2003). Os transtornos depressivos são considerados como uma das formas mais comuns de doença mental e estima-se que afete 350 milhões de pessoas no mundo (M. MARCUS, M.T. YASAMY, M. OMMEREN, D. CHISHOLM, 2012) e isso contribui para o aumento de custos em saúde pública (MOREIRA; FORTALEZA, 2008; PATEL; KLEINMAN, 2003), além do aumento da comorbidade de doenças cardíacas, endocrinologias e cânceres sendo fatores de altos custos econômicos para a sociedade (CASSANO; FAVA, 2002).

Embora os transtornos depressivos tenham importante destaque na saúde pública, sua fisiopatologia ainda não é clara (SHUMAKE; GONZALEZ-LIMA, 2003) e a etiologia dos transtornos depressivos podem ter uma associação entre fatores genéticos, ambientais e neurobiológicos (WONG; LICINIO, 2001). O grande avanço dos possíveis mecanismos neurobiológicos dos transtornos depressivos foi devido a descoberta e utilização na prática clínica de fármacos antidepressivos (STAHL, 1997).

1.2. Tratamentos Farmacológicos dos Transtornos Depressivos

As evidências da eficiência das intervenções psicofarmacológicas culminaram para o grande interesse nas pesquisas referentes a tratamentos das doenças mentais (MOREIRA; FORTALEZA, 2008; PATEL; KLEINMAN, 2003). Essas evidências começaram a surgir a partir da década de 50, quando foram descobertos os primeiros fármacos para o tratamento de humor (STAHL, 1997). Em 1952, Zeller observou que a iproniazida inibia a enzima monoaminoxidase (MAO), que degrada as monoaminas como a dopamina, noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (RAMACHANDRAI et al., 2011). A maioria dos antidepressivos tem ações importantes no metabolismo das monoaminas neurotransmissoras e seus receptores, principalmente a noradrenalina e a serotonina (BUCKLEY; FAUNCE, 2003; OWENS et al., 1997).

Além dos inibidores da MAO, outra classe de fármacos antidepressivos são os antidepressivos tricíclicos que são derivados a partir de anti-histamínicos. Um exemplo dessa classe de fármaco é a imipramina, cujo efeito foi observado por Kuhn, em 1958, que descobriu que ela era relativamente ineficaz como sedativo para pacientes psicóticos agitados, mas produzia efeito notável em pacientes deprimidos. A partir de então, acumularam-se evidências irrefutáveis quanto a eficácia desse fármaco na depressão maior (KNOLLMAN, 2012).

Embora sejam fármacos eficazes como antidepressivos, os inibidores de monoaminoxidase (IMAOs) e os antidepressivos tricíclicos (ADTs) apresentavam muitos efeitos colaterais e letalidade em superdosagem (KESSEL e SIMPSON, 1995 K). Em vista

dos efeitos indesejáveis dos ADTs e IMAOs, surgiram os antidepressivos de segunda geração como, por exemplo, os inibidores seletivos de receptação de serotonina (ISRS), por exemplo fluoxetina e citalopram (PAUL; SKOLNICK, 2003). O interesse das monoaminas para os estudos dos transtornos depressivos refletiram nas teorias para estes transtornos. Sendo assim, na década de 1950, J. Olds sugeriram que a depressão seria decorrente da deficiência da noradrenalina nos sistemas de recompensa. Já Lapin e Oxenbarg propuseram a hipótese serotoninérgica da depressão. Em 1990 Delgado e cols (1990) verificaram que a privação de triptofano, precursor da serotonina, induzia recidiva do quadro depressivo em 80% de pacientes tratados efetivamente com fármacos bloqueadores da receptação da serotonina, os ISRS (GRAEFF; BRANDÃO, 1996).

Para melhor entender o papel da serotonina nas condições psiquiátricas, Deakin e Graeff (DEAKIN; GRAEFF, 1991) propuseram a hipótese do desequilíbrio de receptores de serotonina. Eles acreditavam que os sistemas serotoninérgicos regulariam as respostas adaptativas a eventos aversivos. Assim, o excesso de neurotransmissão mediada por 5-HT₂ na amígdala e córtex frontal levaria ao aumento emocional decorrente do evento aversivo e o efeito oposto seria observado para o subtipo 5-HT_{1A}. Ainda, as projeções do núcleo mediano da rafe (NMnR) para o hipocampo teriam um papel importante nos eventos aversivos crônicos por modular as respostas decorrentes a esses eventos. Tal modulação seria um mecanismo de desconexão dos eventos aversivos a suas consequências emocionais. Contudo, não havendo um bom funcionamento dos mecanismos de adaptação ao estresse, isso resultaria no quadro depressivo no homem e desamparo aprendido em animais (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Para a investigação de hipóteses e fármacos relacionados aos transtornos depressivos, vários modelos animais têm sido utilizados nesta investigação. Alguns exemplos de modelos utilizados para o estudo da depressão são os testes de suspensão pela cauda, do nado forçado, do estresse crônico suave, do estresse social e do desamparo aprendido (NESTLER et al., 2002).

1.3. Desamparo Aprendido

O desamparo aprendido tem como definição a dificuldade de aprendizagem de organismos que passaram por experiência prévia com estímulos incontroláveis (MAIER; SELIGMAN, 1976). O uso como um modelo animal deu-se pela similaridade entre o comportamento de pessoas deprimidas e o comportamento de animais após exposição à choques incontroláveis (HUNZIKER, 2005). Para tanto, o desamparo aprendido é um modelo amplamente utilizado para estudos da depressão por se basear na exposição a um estressor incontrolável como, no caso, os choques elétricos inescapáveis (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a).

Apesar da ampla generalidade de espécies utilizadas em estudos de desamparo aprendido, o rato é o sujeito mais utilizado nestes estudos (HUNZIKER, 2005). Para esse tipo de estudo os animais são expostos a choques escapáveis e sinalizados, após 24h do estressor e, neste contexto, são observados os déficits para fugir ou evitar esses choques (BHATIA et al., 2011; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a; SELIGMAN; BEAGLEY, 1975). É bem estabelecido que a incontrolabilidade dos choques produza alterações fisiológicas além das alterações dos níveis centrais de alguns neurotransmissores (HUNZIKER, 2005). Além do mais, o desamparo aprendido mostra uma diminuição do comportamento em escapar, após estresse repetido e incontrolável, e é semelhante nos parâmetros comportamentais, bioquímicos, fisiológicos e hormonais da depressão (MUNEOKA et al., 2013). Sabe-se ainda que drogas com efeito antidepressivo em humanos tem efeito de impedimento do aparecimento de desamparo aprendido em animais e esse fato tem sido usado para justificar o uso do desamparo aprendido para a identificação de potenciais antidepressivos em humanos (HUNZIKER, 2005).

Este modelo tem sido preditivo à eficácia terapêutica de novos medicamentos e, com isso, permite-se uma base para estudar os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao estresse e respostas de enfrentamento (SHUMAKE; GONZALEZ-LIMA, 2003). Portanto, para avaliar o comportamento de desamparo aprendido em animais nas seções experimentais, são observados algumas variáveis de estudo que podem ser a latência de resposta (variável contínua), os números de falhas, esquivas ou mesmo a fuga ao choque elétrico (variáveis

discretas) ou pode-se utilizar uma variável categórica se for escolhido uma variável de corte para comportamento de desamparo (VOLLMAYR; HENN, 2001).

Com isso, observa-se que o modelo de desamparo aprendido contribuiu para a neurobiologia da depressão na investigação do envolvimento da neurotransmissão mediada por 5-HT_{1A} ou NMDAr no hipocampo (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a) e 5-HT no núcleo dorsal da rafe (NDR) (MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999). Na literatura o NDR e o hipocampo tem sido alvos de estudos com o modelo de desamparo aprendido (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a; MAIER; WATKINS, 2005; RYAN et al., 2010), porém poucos trabalhos são voltados para o NMnR e este modelo experimental.

1.4. Núcleo Mediano da Rafe (NMnR)

O núcleo mediano da rafe (NMnR) é um dos três integrantes do grupo rostral que integra os núcleos da rafe, que são: núcleo linear caudal, NDR e o próprio NMnR. Os núcleos da rafe contém populações heterogêneas de neurônios, mas os neurônios serotoninérgicos são os maiores constituintes. O NMnR se estende a partir do limite caudal para a decussação do pedúnculo cerebelar superior para o nível do núcleo motor trigemial. Mais de 80% dos neurônios do NMnR sintetizam serotonina e poucos neurônios contém outras substâncias (HORNUNG, 2003). Enquanto o NDR tem projeções para o estriado, o hipocampo ventral, a amígdala, o *nucleus accumbens* e o córtex cerebral, o NMnR projeta-se primariamente para o septum e hipocampo dorsal. Porém, ambos núcleos, NDR e NMnR, projetam-se para o córtex, mas o NDR projeta largamente para o córtex frontal e o NMnR distribui mais uniformemente através do córtex e, além disso, os dois núcleos estão conectados entre si (MOKLER et al., 2009).

No rato, a inervação serotoninérgica do prosencéfalo é compartilhada pelo NMnR e pelo NDR. Logo, as fibras do NMnR têm forte distribuição no hipocampo dorsal e ventral. Essas projeções foram vistas em combinações de traçador retrógrado com imunocoloração de 5-HT (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999). Diversas ações da serotonina no hipocampo

sugerem que esse neurotransmissor tem um papel funcional complexo no sistema NMnR/5-HT no hipocampo (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999).

Para tanto, as projeções do NMnR inervam as regiões neocortical e hipocampal e essas projeções previnem a consolidação da memória aversiva e permitem a tolerância para as adversidades crônicas (DEAKIN, 2013). Por isso, o mau funcionamento da via NMnR – hipocampo causa o desamparo aprendido e antidepressivos reestabelecem a neurotransmissão de 5-HT_{1A} (DEAKIN, 2013). Alguns estudos foram feitos para reforçar a ideia de que o NMnR e, conseqüentemente a via NMnR-HD, seriam importantes para desconectar as associações aprendidas em situações aversivas (ANDRADE; GRAEFF, 2001; KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985; NETTO et al., 2002). Dentre esses estudos, os que utilizaram o estresse de imobilização forçada, mostraram que a lesão do NMnR promoveu um efeito comportamental ansiolítico quando animais previamente imobilizados foram submetidos ao labirinto de cruz elevado (LCE) (quadro de desinibição comportamental) (ANDRADE; GRAEFF, 2001; KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985; NETTO et al., 2002). Além disso, esses pesquisadores observaram que quando os animais, com lesão nos neurônios serotoninérgicos, eram repetidamente expostos à imobilização forçada, os mesmos não se adaptavam a este estressor (ANDRADE; GRAEFF, 2001; KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985; NETTO et al., 2002).

Muito se tem feito para poder entender as estruturas envolvidas nos transtornos depressivos, com isso a proposta teórica de Deakin e Graeff recebeu grande apoio de estudos realizados por Kennett e cols (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985; KENNETT; DOURISH; CURZON, 1987). Nesses estudos, os pesquisadores encontraram evidências de que a adaptação ao estresse agudo e/ou crônico envolve a participação de receptores de tipo 5-HT_{1A} e 5-HT₁, respectivamente. Os receptores 5-HT_{1A} encontram-se em abundância no hipocampo, sugerindo que esta estrutura poderia estar envolvida na mediação dos efeitos do tratamento com antidepressivos. Entretanto, essa estrutura recebe densa projeção serotoninérgica oriunda do NMnR, o qual exerce importante efeito modulatório, e essas projeções, após ativação de receptores 5-HT_{1A}, poderiam atenuar a formação de memórias relacionadas ao medo e diminuir as respostas do hipocampo a eventos ameaçadores (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003b).

O NMnR, além de possuir grande quantidade de autoreceptores de tipo 5-HT_{1A}, possui também neurônios não serotoninérgicos como neurônios GABA e de glutamato (CALIZO et al., 2011). O conhecimento da neurobiologia da depressão tem aumentado e, com isso,

aumenta-se os indícios de que as aminas biogênicas não são as únicas em relação à etiologia e tratamento farmacológico dos transtornos depressivos. Novos alvos são considerados para o desenvolvimento de antidepressivos como, por exemplo, o aminoácido glutamato (RAMACHANDRAI et al., 2011), o qual tem sido sugerido em estudos que seus receptores possam regular a atividade de neurônios 5-HT nos NDR e NMnR (GARTSIDE et al., 2007).

1.5. Glutamato

Uma crescente base de dados indica o papel do glutamato com diversos processos no SNC como a plasticidade sináptica, doenças degenerativas, dependência e tolerância a drogas, dor neuropática, ansiedade (CAROBREZ, 2003 - review) e o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica excitatória na fisiopatologia da depressão (HOLTZHEIMER; NEMEROFF, 2006).

O glutamato é um aminoácido que além de ser usado na síntese de proteínas também é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e está relacionado a funções cognitivas importantes como aprendizado e memória (HOLTZHEIMER; NEMEROFF, 2006; MCENTEE; CROOK, 1993). Este aminoácido pode ser encontrado em vesículas sinápticas com a sua liberação através do cálcio (Ca^{++}) ou como precursor do ácido gama aminobutírico (GABA) em sinapses inibitórias. Seus receptores estão divididos em 2 grupos: metabotrópicos (incluem a família de proteínas G acopladas a receptores associados com sistema de segundos mensageiros) e ionotrópicos (incluem o NMDA, AMPA e receptores cainato) (HOLTZHEIMER; NEMEROFF, 2006). Os receptores ionotrópicos foram classificados, ainda, de acordo com o agonista mais seletivo e, portanto, divididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpro- prionato) e cainato, os quais são compostos de 4 ou 5 subunidades que, quando agrupados, formam um poro central por onde há condutância para Ca^{++} ou sódio (Na^+) (CAROBREZ, 2003).

O subtipo NMDA possui várias subunidades denominadas como NR1 (com sítio de ligação para glicina), NR2A-D (com sítio de ligação para o glutamato) e NR3A-B. A combinação de duas subunidades NR1 com duas subunidades NR2 compõem a maior parte

dos receptores presentes no SNC que, portanto, tendo o glutamato ligando-se com alta afinidade na subunidade NR2 em associação com a glicina na subunidade NR1, promoveriam a entrada de Ca^{++} e Na^+ contribuindo para a excitabilidade da célula (CAROBREZ, 2003). A ativação dos receptores NMDA (NMDAr) desencadeiam a transmissão sináptica excitatória, a plasticidade neuronal e a neurotoxicidade no sistema nervoso central (NEI et al., 1996). Essa ativação tem participação na potenciação em longo termo (LTP, sigla em inglês) que é uma forma de plasticidade sináptica no hipocampo, além da depressão de longo termo (LTD, sigla em inglês), as quais são modelos frequentemente usados para entender os mecanismos celulares subjacentes à formação da memória (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

Dada a importância dos NMDAr, estes apresentam-se em grande quantidade no NMnR (HOLTZHEIMER; NEMEROFF, 2006; MCENTEE; CROOK, 1993). Com isso, estes neurônios glutamatérgicos exercem controle tônico sobre o funcionamento do NMnR e sobre a liberação de serotonina no próprio NMnR e no Hipocampo, sendo que, tais mecanismos seriam responsáveis pela adaptação a estímulos aversivos repetidos (GARTSIDE et al., 2007; TAO; AUERBACH, 2003). Esse mecanismo envolveria a existência de receptores de glutamato de tipo NMDAr em neurônios serotoninérgicos de projeção para o hipocampo (GARTSIDE et al., 2007; TAO; AUERBACH, 1996). Com isso, a ativação desses neurônios do NMnR pela administração de NMDA promoveria a liberação de serotonina que, na presença de receptores 5HT_{1A} do NMnR, levaria a uma inibição da via NMnR – Hipocampo, atenuando os efeitos da exposição ao estresse (ALMEIDA et al., 2013; AZMITIA; SEGAL, 1978; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999).

Entretanto, pouco se sabe sobre o papel dos NMDAr no NMnR e seu envolvimento nos mecanismos de adaptação ao estresse. Portanto, nossa hipótese é de que a ativação dos receptores glutamatérgicos do NMnR seria importante para essa adaptação ao estresse. Assim, a administração de agonistas de receptores de glutamato do tipo NMDAr no NMnR seriam capazes de prevenir ou atenuar os efeitos da exposição a choques elétricos inescapáveis.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar se a administração de agonista de receptor de N-metil D-Aspartato (NMDAr) no Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) é capaz de prevenir ou atenuar os efeitos da exposição a choques elétricos inescapáveis em ratos.

2.1. Objetivos específicos

- a. Investigar os efeitos comportamentais após tratamento com salina + salina, AP7 + salina, salina + NMDA e AP7 + NMDA no NMnR sem a exposição a choques inescapáveis em ratos submetidos a choques escapáveis sinalizados 24 horas depois;
- b. Investigar os efeitos comportamentais em ratos tratados com salina + salina, AP7 + salina, salina + NMDA e AP + NMDA no NMnR antes da exposição a choques inescapáveis e testados 24 h depois;
- c. Investigar os efeitos comportamentais em ratos tratados com salina + salina, AP7 + salina, salina + NMDA e AP7 + NMDA no NMnR imediatamente depois da exposição a choques inescapáveis e testados 24 h depois.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sujeito experimental

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Ribeirão Preto (USP-RP), com idade aproximada de sete (7) semanas e massa corporal de aproximadamente trezentos gramas (300g).

Os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da USP – *campus* Ribeirão Preto (processo número 06.1.1131.53.0).

3.2. Fármacos e insumos

Para o procedimento de cirurgia estereotáxica foram utilizados: anestésico de ação central 2, 2, 2-tribromoetanol (2,5% (Sigma-Aldrich®, USA), dose de 250mg/kg, diluído em água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para) e administrado por via intra-peritoneal (i.p.; volume de injeção de 10mL/kg). Foram utilizados também a solução hidroalcoólica de iodo a 2% (Riodeine®) e o anestésico local de cloridrato de lidocaína, Novocol® 100 (S.S. White-Brasil), associado a um vasoconstrictor noradrenalina (a 0,04%), administrado em dose única do volume de injeção de 0,2mL/animal por via subcutânea (s.c.). Também foram administrados nos animais uma associação antibiótica de amplo espectro (pentabiótico Fort Dodge, 240.000 UI a um volume de 0,2mL/animal administrado intra-muscular (i.m.) diluída em água destilada estéril) e o anti-inflamatório, analgésico e antipirético flunixinina meglumina (Banamine® Injetável, Schering-Plough; dose de 2,5 mg/kg; s.c.). Foi utilizado também cimento acrílico auto-polimerizável, de uso odontológico para modelagem de base para fixação de cânula guia e proteção do crânio. Para as devidas esterilizações foi utilizada solução hidroalcoólica de etanol a 70% (LABSynth®).

Os fármacos utilizados para as injeções intracerebrais foram o N-metil-D-aspartato (NMDA), agonista de NMDAr, na dose de 1 nmol/0,2 μ L, o ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP7), antagonista de NMDAr, na dose de 3 nmoles/0,2 μ L e solução de salina estéril. Os fármacos NMDA e AP7 são provenientes da empresa Sigma-Aldrich® USA e foram diluídos em salina estéril e as doses foram definidas em experimentos realizados no LabNED em estudos prévios.

Para a perfusão transcardíaca dos animais foram utilizados o anestésico uretana (25%; Sigma-Aldrich®, USA) diluído em água destilada q.s.p. e administrado i.p. (5mL/kg). Foram preparados e utilizados para a perfusão a solução salina (0,9%) para a lavagem dos tecidos dos animais e a solução de formaldeído (10%). Foi utilizada também solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4 (PBS).

3.3. Equipamentos e demais materiais utilizados

Para o procedimento cirúrgico foram utilizadas cânulas de aço inoxidável (14mm), aparelho estereotáxico (Stoelting), parafusos para fixação do cimento acrílico ao crânio, mandris de aço inoxidável colocados nas cânulas para evitar entupimento das mesmas e evitar infecções, agulhas gengivais 30G para injeção do anestésico, agulhas hipodérmicas (0,60 x 25mm e 0,45 x 13mm) e seringas de 3mL e 1mL para administrações dos fármacos utilizados no procedimento cirúrgico. Os instrumentos utilizados na cirurgia foram pinça, tesoura, bisturi, rotomática com broca de aço, espátula e pipeta “Pasteur” para preparo de cimento acrílico.

Para o procedimento experimental de administração intracerebral (i.c.) de fármacos foram utilizados uma bomba de infusão da empresa Insight® Pesquisa e Ensino (modelo EFF 311), agulhas gengivais 30G (de 15mm), micro seringas Hamilton de 10 μ L e segmentos de polietileno (PE 10).

Para as condições experimentais foram utilizadas duas (2) Caixas de Esquiva Ativa para ratos (Insight® Pesquisa e Ensino, modelo EP 111) com dimensões 307 x 333 x 540 mm, confeccionados em acrílico, com uma tampa com dobradiça na parte superior em cada uma

das caixas e no interior de cada caixa era separada por uma porta divisória com uma abertura central para permitir os cruzamentos dos animais entre os compartimentos da caixa. O piso inferior era confeccionado em barras de aço inox, para a apresentação de choques elétricos, e cada caixa era dotada de sensores infravermelhos para captar os cruzamentos dos animais. Para o ajuste dos choques elétricos as caixas continham um interruptor cada para a seleção de intensidade dos mesmos. Para evitar o aprendizado por contexto, uma das caixas continha nas paredes de acrílico listras pretas verticais e a outra caixa não tinha nada em suas paredes. Cada Caixa de Esquiva Ativa estava interligada a um microcomputador que era dotado do *software* Esquiva Ativa 3.8.91 (Insight® Pesquisa e Ensino) para programação dos procedimentos de apresentação dos estímulos aos animais quanto a duração dos choques elétricos, os estímulos de luz e a duração dos intervalos e quantidade de ciclo de estímulos (*trials*). Esse mesmo *software* também era responsável por gerar um relatório das respostas emitidas pelos animais em teste. Cada Caixa de Esquiva Ativa estava isolada por um *box* de Isolamento (Bonther Equipamentos) confeccionado em madeira e cortiça, com exaustão e circulação de ar interno e uma porta de acesso com vidro central.

A perfusão foi feita com solução salina e paraformaldeído a 10% com o auxílio de um sistema de perfusão com uma agulha hipodérmica (35 x 1,2 mm) utilizada para a injeção das soluções no coração. Foi utilizado também uma guilhotina (Bonter Equipamentos) para a decapitação. O encéfalo foi retirado das cabeças dos animais com o auxílio de tesoura, boticão e pinça.

Para os cortes histológicos utilizou-se um aparelho criostato (Leica®, modelo CRYOCUT 1.800), lâminas histológicas (Precision Glass Line 26,0 x 76,0mm). As lâminas foram analisadas através do microscópio Leica® (DM5500 B).

3.4. Procedimentos

Esta pesquisa foi dividida em 3 condições experimentais e, em cada condição, receberam os para 4 grupos de tratamentos farmacológicos. Cada condição experimental foi realizada em um estudo distinto das outras condições, descrito a seguir.

3.4.1. Estudo 1: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente antes da exposição ao choque inescapável (CI) em ratos submetidos ao desamparo aprendido (inj + CI → CE).

Objetivo: Investigar se o tratamento com NMDA previamente à exposição ao choque elétrico inescapável (CI) é capaz de prevenir o desenvolvimento de desamparo aprendido em ratos e se o tratamento com AP7 é capaz de antagonizar os efeitos do NMDA.

Para este estudo os animais provenientes do Biotério Central da USP-RP foram alocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia de Estresse e Depressão (LNED) do departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP). Ao chegar no LNED foram imediatamente separados aos pares em gaiolas de polipropileno (40 x 33 x 17 cm) forradas com serragem e com tampa de grade metálica onde estavam permanentemente disponíveis aos animais água filtrada e ração (Nuvilab® CR-1 autoclavável). Os animais estavam sob os controles de luminosidade com ciclo de claro-escuro de 12/12 horas (com início do período claro às 7 horas da manhã) e temperatura de 22°C (±1°C). A rotina de higienização das gaiolas era feita em dias alternados. Após 48h de ambientação no biotério, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica descrita a seguir.

3.4.1.1. Cirurgia estereotáxica

Após a montagem da mesa cirúrgica, os animais eram pesados e identificados com uma marcação a tinta na cauda. Como o peso estabelecido, o volume da injeção de anestésico

2,2,2-tribromoetanol era calculado e administrado por via i.p. em cada animal. Em seguida cada animal era submetido a tricotomia na parte superior da cabeça na região de introdução da cânula guia. Após esse procedimento, cada animal foi fixado no estereotáxico pelo rochedo temporal e pelos incisivos superiores com a barra dos incisivos com inclinação de -3,3mm abaixo da linha interaural (PAXINOS; WATSON, 1986). Com o animal já fixo no estereotáxico, o campo cirúrgico e os locais de injeções foram limpos e desinfetados com a solução hidroalcoólica de iodo a 2% embebido em algodão. Após a limpeza, o anestésico local Novocol® 100 foi administrado pela via s.c. no campo cirúrgico e, para prevenir infecções e auxiliar na recuperação dos animais, a associação antibiótica de amplo espectro pentabiótico foi administrada pela via i.m. na coxa direita e o anti-inflamatório, analgésico e antipirético flunixinina meglumina foi administrado pela via s.c. no dorso do animal.

Após as injeções, o escalpo no campo cirúrgico foi feito para expor o crânio para efetuar a raspagem e remoção do periósteo e possibilitar a secagem desse campo, para identificação do Bregma e possibilitar melhor fixação da prótese acrílica. O Bregma é um ponto da união das suturas sagital e coronal do rato e é utilizado como referência para as leituras de coordenadas da estrutura encefálica alvo. As coordenadas utilizadas foram previamente calculadas a partir das referências do Atlas de coordenadas estereotáxicas do cérebro de rato (PAXINOS; WATSON, 1986): anteroposterior a -7,3mm, latero-lateral a 2,7mm, profundidade dorsoventral a -7,8mm e inclinação da haste a 18°. Concluído as leituras e o posicionamento da cânula guia, três orifícios foram perfurados com a rotomática no crânio de cada animal, sendo dois para a fixação de parafusos que davam apoio à prótese de acrílico e o terceiro orifício para a inserção da cânula. Após a inserção da cânula e dos parafusos, o cimento acrílico foi acrescentado sobre o campo cirúrgico para fixação da cânula e isolamento desse campo. Após a secagem do acrílico, a cânula guia e o braço do estereotáxico foram removidos e o mandril foi inserido nesta cânula, sendo que sua extremidade livre foi fixada com cimento acrílico.

Por fim, os animais foram retirados do estereotáxico e colocados em uma gaiola de polipropileno com serragem sob uma luz incandescente de 60W para a recuperação pós-operatória. Uma vez conscientes, os animais foram levados de volta as suas respectivas gaiolas e passaram por um período de recuperação de 7 dias, mantendo a rotina de limpeza das gaiolas e o acesso livre de água e ração. Após esse período, os animais foram submetidos aos tratamentos farmacológicos com é descrito na sequência.

3.4.1.2. Tratamentos farmacológicos

Após recuperação da cirurgia estereotáxica ou após a exposição aos choques elétricos inescapáveis nas patas, a depender da condição experimental, cada animal recebeu 2 injeções i.c. de volume de 0,2 μ L cada, a uma taxa de infusão de 0,4 μ L/min com o auxílio da bomba de infusão. Ao fim da infusão de cada injeção i.c. foi esperado 1 minuto para evitar o refluxo da droga e, após esse tempo, a agulha foi retirada da cânula da cabeça do animal. As injeções foram administradas com intervalo de cinco minutos (5 min) entre elas, respeitando-se, ainda, este intervalo quando do procedimento subsequente (exposição a caixa ou retorno a gaiola-viveiro no biotério), ou seja, após a segunda injeção também houve espera de 5 min para a próxima etapa. Os animais foram divididos em quatro grupos, dentro de cada condição experimental, de acordo com o tratamento farmacológico: salina + salina, AP7 3 nmoles/0,2 μ L + salina (AP7 + sal), salina + NMDA 3 nmoles/0,2 μ L (sal + NMDA) ou AP7 + NMDA.

Imediatamente após as injeções, os animais deste estudo foram submetidos à exposição da seção experimental de choques elétricos inescapáveis (CI). Para as seções experimentais, a preparação da sala experimental e dos equipamentos seguiu uma rotina igual para todas as condições experimentais. Essa rotina consistia em ligar o ar condicionado desta sala, diminuir a intensidade da iluminação da sala pela metade, ligar as Caixas de Esquiva Ativa, assim como as ventoinhas dos boxes de isolamento e os computadores e iniciar os programas dos computadores com os esquemas de apresentação aos estímulos. Após esses procedimentos, os animais eram colocados nas Caixas de Esquiva Ativa conforme os protocolos experimentais. Estabelecida essa rotina e iniciado o protocolo experimental, a sala de experimentação era interditada para circulação de pessoas. Terminada a seção experimental, o experimentador retirava os animais das Caixas de Esquiva Ativa, limpava as mesmas com solução hidroalcoólica 70%, colocava os próximos animais e iniciava uma nova seção experimental.

3.4.1.3. Choques elétricos inescapáveis (CI)

Para os animais que tinham como procedimento experimental os choques elétricos inescapáveis nas patas (CI), eles foram expostos a 40 choques elétricos nas patas com intensidade de 0,6 mA durante dez segundos (10s) com intervalos variáveis de $60s \pm 30s$ (figura 2). Após a sessão de CI, os animais retornaram às suas respectivas gaiolas no biotério.

O CI foi baseado na literatura (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a; SELIGMAN; BEAGLEY, 1975) e os esquemas de apresentação do choque e intervalo seus respectivos tempos foram baseados em dados prévios do nosso Laboratório de Neurobiologia do Estresse e Depressão (LNED) (figura 1).

Figura 1 - Representação do ciclo de estímulos em CI Estímulo com seu respectivo tempo e intervalo em um ciclo de estímulos na condição de choque elétrico escapável inescapável (CI).

Após 24h, os animais foram expostos a seção experimental de choque elétrico escapável sinalizado (CE) conforme descrito a seguir.

3.4.1.4. Choque escapável sinalizado (CE)

Após 24h do CI, os animais foram expostos ao choque escapável sinalizado (CE). Esse procedimento foi realizado novamente na Caixa de Esquiva Ativa, com todas as ambientações da sala de experimentação conforme descrito para a seção de CI, sendo que cada animal foi colocado na caixa distinta a qual foi colocado no dia anterior, ou seja, se o animal tivesse sido colocado na caixa sem as listras verticais no primeiro dia no segundo dia ele foi colocado na caixa com listras verticais e vice e versa, para não haver aprendizado por contexto.

No dia do CE, os animais foram expostos a 30 ciclos de estímulos (*trials*), sendo que cada *trial* era composto de um esquema em que consistiu na apresentação de uma luz de *led* na caixa de esquiva ativa com intensidade igual 15W em um período de 10s. Simultaneamente, iniciou-se o estímulo choque-luz por 10s, sendo que a luz não se apagava e o choque iniciava, e, após esse tempo de 20s, havia um intervalo variável de $60s \pm 30s$ (Figura 4). As respostas emitidas pelos animais de cruzamento de um lado para o outro na Caixa de Esquiva Ativa através da divisória com abertura central foram captados pelos sensores infravermelhos e registrados pelo *Software* Esquiva Ativa 3.8.91.

O CE foi baseado na literatura (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a; SELIGMAN; BEAGLEY, 1975) e os esquemas de apresentação de estímulos e seus respectivos tempos foram baseados em dados prévios do nosso Laboratório de Neurobiologia do Estresse e Depressão (LNED) (figura 2).

Figura 2 – Representação do ciclo de estímulos em CE Estímulos com seus respectivos tempos e intervalo em um ciclo de estímulos na condição de choque elétrico escapável sinalizado (CE).

3.4.1.5. Perfusão

Após o procedimento de CE, os animais foram anestesiados com uretana a 25% pela via i.p. Em seguida realizou-se uma incisão ventral na linha média para exposição da cavidade abdominal e ruptura do diafragma para a exposição da caixa torácica e do coração. Com o coração exposto, uma agulha hipodérmica conectada ao sistema de perfusão foi inserida no ventrículo esquerdo de cada animal para que iniciasse a perfusão transcárdica com a circulação, de aproximadamente 200mL, de solução salina, seguida pela solução de formaldeído 10%.

Ao término da perfusão, as cabeças dos animais foram guilhotinadas e os encéfalos removidos e colocados em solução de formaldeído 10% por 2h. Após esse tempo, os encéfalos foram crioprotetidos em solução de sacarose 30% por 48h, congelados e armazenados em *freezer* a -20°C.

3.4.1.6. Análise histológica

Depois de congelados, os encéfalos foram cortados no criostato em secções de 50µm para que fosse coletado fatias representativas do NMnR, tendo como orientação as figuras 47 a 51 do Atlas de coordenadas do cérebro do rato (PAXINOS; WATSON, 1986) e colocados em lâminas histológicas e, após secas, as mesmas foram analisadas ao microscópio para confirmação do sítio de injeção.

Na figura 3 é mostrada uma fotomicrografia representativa da localização dos sítios de injeção i.c. (intracerebrais) e uma representação da disposição desses sítios de injeções (modificado Paxinos, Watson, 1986) dos cortes coronais encefálicos onde ocorreram as injeções.

Figura 3 – Representação do sítio de injeção no núcleo mediano da Rafe (NMnR). [A] Fotomicrografia representativa mostrando o sítio de injeção i.c. no NMnR. Aumento de 320x. [B] Representações esquemáticas de cortes coronais de encéfalo de rato (PAXINOS; WATSON, 1986) usados como guia para a identificação nas análises histológicas, tendo como referência a sutura do Bregma. Os círculos (●) representam os sítios de injeção i.c. dentro e os triângulos (▲) representam os sítios de injeção i.c. fora do NMnR. Aq = aqueduto cerebral.

Os cruzamentos dos animais de um compartimento de cada Caixa de Esquiva Ativa para o outro lado oposto foram registrados pelo *Software* Esquiva Ativa 3.8.91, conforme os procedimentos experimentais descritos para o CE. As respostas dadas pelos animais e contadas pelo *Software* foram registradas como respostas de esquiva, fuga ou falha, sendo que, estas respostas eram excludentes entre si, ou seja, em cada *trial* podia apresentar apenas uma resposta. Também foram registrados os cruzamentos totais dos animais durante toda a seção experimental bem como a latência para emissão de resposta dos mesmos.

As respostas de esquiva eram registradas quando os animais cruzavam a caixa durante a apresentação da luz dentro do tempo de 10s. Já a resposta de fuga era registrada quando os animais cruzaram a caixa durante a apresentação da luz e choque. Quando os animais permaneciam no mesmo lado da Caixa de Esquiva Ativa, ou seja, quando eles não a cruzavam a caixa durante os 20s de apresentação dos estímulos, era registrado pelo *Software* como uma falha.

O *Software* Esquiva Ativa 3.8.91 gerou o registro das variáveis dependentes, que foram as respostas e latências para respostas em cada *trial* totalizando os 30 *trials*. As frequências simples de cada variável dependente dentro de cada *trial* foram agrupadas em cinco (5) *trials* consecutivos, resultando em um bloco da respectiva variável e, assim por diante, até completar os 30 *trials*. Cada bloco de resposta dependente foi chamado de BT, totalizando 6 blocos (BT1 a BT6) de 5 *trials* consecutivos para cada variável de cada animal. A figura 4 mostra cada variável dependente e seus respectivos blocos agrupados em uma seção experimental de CE.

Variável dependente	Blocos de respostas por ciclo					
	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5	BT6
Esquiva	Σ 1-5	Σ 6-10	Σ 11-15	Σ 16-20	Σ 21-25	Σ 26-30
Fuga	Σ 1-5	Σ 6-10	Σ 11-15	Σ 16-20	Σ 21-25	Σ 26-30
Falha	Σ 1-5	Σ 6-10	Σ 11-15	Σ 16-20	Σ 21-25	Σ 26-30
Cruzamento	Σ 1-5	Σ 6-10	Σ 11-15	Σ 16-20	Σ 21-25	Σ 26-30
Latência	Σ 1-5	Σ 6-10	Σ 11-15	Σ 16-20	Σ 21-25	Σ 26-30

Figura 4 - Agrupamento das variáveis dependentes em BTs durante uma seção experimental de 30 *trials* de C.E. Cada BT de cada resposta corresponde à soma [Σ] de 5 frequências simples consecutivas de cada resposta por *trial* totalizando 30 *trials*. Os intervalos das somas correspondem aos *trials*.

Após a organização dos dados em BT, foi calculada a porcentagem de desamparo aprendido (%DA), sendo que para um animal ser considerado com desamparo aprendido este deveria apresentar número de falhas maior ou igual a 10 ($\text{falha} \geq 10$) durante toda a seção de CI (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a). Após o processamento dos dados, as análises estatísticas foram feitas.

3.4.1.8. Análise estatística

O *software* utilizado para a análise estatística foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) Version 21.0. Armonk: SPSS Inc.; 2012. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), sendo o número de respostas, cruzamento ou a latência (em segundos [s]) em função dos BTs.

A análise estatística de Manova de medidas repetidas foi feita para os dados de respostas de esquiva, fuga ou falha, além dos cruzamentos e latência, tendo como fatores os tratamentos farmacológicos e as condições experimentais. As comparações *a posteriori* foram realizadas com o teste de Bonferroni. O nível de significância foi de 95% ($p < 0,05$).

A análise estatística utilizada para os dados de desamparo aprendido (DA) dentro de cada condição experimental foi o teste de Qui quadrado de Pearson, sendo o nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados em % de DA.

Os dados dos testes univariados passaram no critério de igualdade das variâncias, segundo o teste de Levene.

3.4.2. Estudo 2: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente após da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido (CI + inj → CE).

Objetivo: Investigar se o tratamento com NMDA após a exposição a CI é capaz de prevenir o desenvolvimento de desamparo aprendido em ratos e se o tratamento com AP7 é capaz de antagonizar os efeitos do NMDA.

Para este estudo os animais provindos do biotério central da USP-RP foram alocados no LNED e, após 48h de ambientação, foram submetidos à cirurgia estereotáxica, conforme procedimentos descritos no Estudo 1. Após o período de recuperação, os animais foram expostos aos procedimentos de choques elétricos inescapáveis (CI) (ver item 3.4.1.3) e só então receberam os tratamentos farmacológicos (ver item 3.4.1.2), para após 24h, serem submetidos aos choques elétricos escapáveis sinalizados (CE) (ver item 3.4.1.4). Os procedimentos de CI, tratamentos farmacológicos e CE foram descritos conforme o Estudo 1, além dos procedimentos de perfusão, histologia, análise de dados e estatística.

3.4.3. Estudo 3: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA em ratos que não foram submetidos aos choques elétricos inescapáveis (inj → CE).

Objetivo: Investigar se o tratamento com NMDA apresenta mudança comportamental em ratos não expostos aos choques elétricos inescapáveis e se o tratamento com AP7 é capaz de antagonizar os efeitos do NMDA.

Para este estudo os animais provindos do biotério central da USP-RP foram alocados no LNED e, após 48h de ambientação, foram submetidos à cirurgia estereotóxica, conforme procedimentos descritos no Estudo 1. Após o período de recuperação, os animais receberam os tratamentos farmacológicos, conforme descrito nos estudos anteriores, e permaneceram nas Caixas de Esquiva Ativa por 20 minutos sem receberem choques elétricos nas patas com todas as ambientações, assim como descritas nas outras seções experimentais. Após 24h, os animais foram submetidos a seção de CE (ver item 3.4.1.4) onde o *software* gerou os dados dos comportamentos dos animais e os quais foram analisados conforme descrito no Estudo 1, assim como os procedimentos de perfusão, histologia e análise estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo 1: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente antes da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido (inj + CI → CE).

Os resultados mostram que a Manova mostrou não haver interação dos tratamentos nos BTs nas respostas de fuga ($F_{15,147} = 1,298$; $p > 0,05$) e de falha ($F_{15,147} = 1,128$; $p > 0,05$). Porém houve diferença significativa na resposta de esquiva ($F_{15,147} = 2,568$; $p < 0,05$), sendo que a análise *post hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$) mostrou que o tratamento de AP7 + NMDA aumentou o número de esquivas ao longo dos BTs em comparação ao tratamento salina + salina. A figura 5 mostra as curvas de respostas dos animais em relação a cada tratamento e de todos os tratamentos juntos em relação aos BTs.

A figura 6 demonstra os cruzamentos e as latências de respostas para cada tratamento e de todos os tratamentos juntos em relação aos BTs. A Manova mostrou não haver interação entre dos tratamentos nos BTs dos cruzamentos ($F_{15,147} = 0,953$; $p > 0,05$), mas houve diferença significativa para a latência ($F_{15,147} = 1,957$; $p < 0,05$) que, na análise *post hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$), mostrou que o tratamento de AP7 + NMDA diminuiu o tempo de latência das respostas ao longo dos BTs em comparação ao tratamento salina + salina

Respostas dos animais em CE

inj + CI → CE

Figura 5 - Efeito dos tratamentos sobre as respostas dos animais no estudo 1. A análise estatística de Manova de medidas repetidas com o teste *post hoc* de Bonferroni, com $p < 0,05$. O asterisco (*) mostra a diferença significativa entre as curvas.

Respostas dos animais em CE

inj + CI → CE

Figura 6 - Efeito dos tratamentos sobre os cruzamento e latência de resposta dos animais no estudo 1. A análise de Manova de medidas repetidas com o teste *post hoc* de Bonferroni, com $p < 0,05$. O asterisco (*) mostra a diferença significativa entre as curvas.

Na figura 7 são mostradas as porcentagens de desamparo aprendido (%DA) em função aos tratamentos. Não houve efeito dos tratamentos para as porcentagens de desamparo aprendido no estudo 1 ($\chi^2 = 6,018$; $n = 55$; $gl = 3$; $p > 0,05$).

Figura 7 -Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido no estudo 1. Injeções i.c. e CI e, após 24, CE. Os números no interior de cada barra correspondem ao número de animais (n) utilizado para o respectivo tratamento neste estudo.

4.1.1. Discussão do Estudo 1

O objetivo desse experimento foi avaliar se os tratamentos farmacológicos têm algum efeito sobre as respostas dos animais quando estes são administrados previamente à exposição aos choques elétricos inescapáveis (CI).

Não houve totalidade de desamparo aprendido nos animais do tratamento salina + salina, porque pode haver diferenças genéticas que determinem a sensibilidade dos animais quanto ao choque elétrico (HUNZIKER, 2005). Já a diferença entre os tratamentos AP7 + NMDA e salina + salina mostra que houve um aumento do número de esquivas ao longo da seção de choque elétrico sinalizado, sugerindo que houve aprendizado quanto ao pareamento do estímulo neutro (luz) como antecedente ao estímulo de choque elétrico. A diminuição da latência de resposta ao longo da seção de C.E. para o tratamento de AP7 + NMDA corrobora com os resultados da resposta de esquiva, sendo que para emitir a resposta de esquiva deve haver latência de resposta média baixa. Também, o número de cruzamentos

médio baixo indica que não houve nenhum efeito locomotor das drogas nos animais, reforçando a ideia de que houve aprendizado.

Esses resultados corroboram dados obtidos em estudos prévios de nosso laboratório que mostraram que o tratamento de AP7 + NMDA reverteu o efeito de estresse nos ratos no nado forçado. Esses dados mostraram que, nos experimentos onde as injeções i.c. prévias ao estresse, os tratamentos com AP7 atenuou o desespero comportamental e o tratamento de AP7 e NMDA diminuiu o tempo total de imobilidade dos animais. Portanto, pode-se entender que houve diminuição dos efeitos aversivos dos animais frente a uma nova exposição ao estressor no nado forçado.

Fato semelhante ocorreu com o aumento de esquivas nesse experimento, pois evidencia que houve adaptação ao estresse quando os animais foram expostos novamente aos choques elétricos e os mesmos aprenderam à esquiva pareando o estímulo neutro com a consequência aversiva.

O antagonista de receptores NMDA apresenta efeitos antidepressivos no teste de nado forçado e as evidências levam para o hipocampo, estrutura que tem sido implicada nas respostas comportamentais e neuroquímicas para estímulos aversivos (PADOVAN; GUIMARÃES, 2004). Como o AP7 é um antagonista competitivo no NMnR (KINNEY; KOCSIS; VERTES, 1994), então o NMDA não se liga aos receptores, sendo que o comportamento resultante é quanto ao efeito do antagonista. Sendo assim, com o bloqueio da liberação de glutamato no NMnR pelo AP7 não houve aumento da liberação de serotonina que atuaria sobre os receptores de 5-HT_{1A} no NMnR o que levaria a inibição da via NMnR hipocampo após o agente estressor, sendo o efeito foi o oposto aos dados vistos na literatura, ou seja, pela ativação dos receptores de NMDA (ALMEIDA et al., 2013; AZMITIA; SEGAL, 1978; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999).

4.2. Estudo 2: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA imediatamente após da exposição a CI em ratos submetidos ao desamparo aprendido (CI + inj $\rightarrow$ CE).

Os resultados desse estudo são mostrados nas figuras a seguir, sendo que a figura 8 mostra as curvas de respostas dos animais em relação a cada tratamento e de todos os tratamentos juntos em relação aos BTs. A Manova mostrou não haver interação dos tratamentos entre os BTs das respostas de esquiva ($F_{30,720} = 0,948$; $p > 0,05$), fuga ($F_{30,720} = 0,819$, $p > 0,05$) e falha ($F_{30,720} = 0,969$; $p > 0,05$).

Na figura 9 são demonstrados os cruzamentos e as latências de resposta para cada tratamento e de todos os tratamentos juntos em relação aos BTs. A Manova também não mostrou interação dos tratamentos entre os BTs de cruzamentos ($F_{30,720} = 0,628$; $p > 0,05$) e de latência ($F_{30,720} = 0,960$; $p > 0,05$).

Respostas dos animais em CE

CI + inj → CE

Figura 8 - Efeito dos tratamentos sobre as respostas dos animais no estudo 2. A análise estatística de Manova de medidas repetidas com $p < 0,05$.

Respostas dos animais em CE

CI + inj → CE

Figura 9 - Efeito dos tratamentos sobre os cruzamento e latência de resposta dos animais no estudo 2. A análise estatística de Manova de medidas repetidas com $p < 0,05$.

Na figura 10 são mostradas as porcentagens de desamparo aprendido (%DA) em função dos tratamentos. Não houve efeito dos tratamentos para as porcentagens de desamparo aprendido no estudo 2 ($\chi^2 = 4,07$; $n = 56$; $gl = 3$; $p > 0,05$).

Figura 10 - Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido no estudo 2. Exposição ao CI e injeções i.c. e, após 24, CE. Os números dentro de cada barra é o número de animais (n) utilizado para o respectivo tratamento neste estudo.

4.2.1. Discussão do Estudo 2

O objetivo desse experimento foi avaliar se os tratamentos farmacológicos têm algum efeito sobre as respostas dos animais quando estes são administrados imediatamente após a exposição aos choques elétricos inescapáveis.

Evidências mostram que a interferência na consolidação de memória aversiva atenua o impacto emocional do evento aversivo, permitindo que o animal desenvolvesse uma tolerância ao evento aversivo (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a). Os dados com os tratamentos com agonista de receptor NMDA no NMnR indicam um aumento da taxa de desamparo aprendido.

4.3. Estudo 3: Efeitos comportamentais do tratamento intra-NMnR com AP7 e/ou NMDA em ratos que não foram submetidos aos choques elétricos inescapáveis (inj → CE).

Os resultados mostram que a Manova mostrou não haver interação entre os tratamentos e os BTs para as respostas de esquiva ($F_{30,720} = 0,948$; $p > 0,05$), de fuga ($F_{30,720} = 0,819$, $p > 0,05$) e de falha ($F_{30,720} = 0,969$; $p > 0,05$). A figura 11 mostra as curvas de respostas dos animais para cada tratamento e para todos os tratamentos juntos em relação aos BTs.

Na figura 12 são demonstrados os cruzamentos e as latências de resposta para cada tratamento e de todos os tratamentos juntos em relação aos BTs. A Manova também não mostrou interação entre os tratamentos e os BTs para os cruzamentos ($F_{30,720} = 0,628$; $p > 0,05$) e para a latência ($F_{30,720} = 0,960$; $p > 0,05$).

Respostas dos animais em CE

inj → CE

Figura 11 – Efeito dos tratamentos sobre as respostas dos animais no estudo 3. A análise estatística de Manova de medidas repetidas com $p < 0,05$.

Respostas dos animais em CE

inj → CE

Figura 12 - Efeito dos tratamentos sobre os cruzamento e latência de resposta dos animais no estudo 3. A análise estatística de Manova de medidas repetidas com $p < 0,05$.

Na figura 11 são mostradas as porcentagens de desamparo aprendido (% DA) em função aos tratamentos. Não houve efeito dos tratamentos para as porcentagens de desamparo aprendido no estudo 3 ($\chi^2 = 0,42$; $n = 45$; $gl = 3$; $p > 0,05$).

Figura 13 - Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido no estudo 3. Injeções i.c. e SE e, após 24, C.E. Os números dentro de cada barra é o número de animais (n) utilizado para o respectivo tratamento neste estudo.

4.3.1. Discussão do Estudo 3

O objetivo desse experimento foi estabelecer um controle comportamental para os demais experimentos. Neste experimento os animais receberam as injeções i.c., mas não receberam os choques inescapáveis e, após 24 horas, foram submetidos aos choques elétricos sinalizados.

Neste experimento esperava-se não haver diferença entre a porcentagem de desamparo entre os animais para os diferentes tratamentos, pois os mesmos não foram submetidos à exposição aos choques inescapáveis, como descritos na literatura (SELIGMAN; BEAGLEY, 1975). Somado a esses dados, a baixa porcentagem do desamparo aprendido esperado para as taxas de desamparo também corrobora com esses resultados.

O tratamento salina + salina desta condição experimental, quando comparado com o mesmo tratamento das demais condições experimentais, do Estudo 1 e 2, é possível verificar alterações comportamentais

As curvas para cada resposta foram semelhantes para todos os tratamentos, mostrando não haver efeito de nenhum tratamento sobre o comportamento dos animais sem a pré-exposição ao choque. Nas fugas mantiveram-se com uma média alta e praticamente constante. Já as respostas de esquiva diminuíram com o tempo da seção devido à alta taxa de cruzamentos mostrando uma atividade locomotora alta para todos os tratamentos no início da seção. Também, o aumento da latência condiz com a diminuição das esquivas, sendo que a esquiva é a resposta que demanda menos tempo (até 10s) para que o animal emita esta resposta.

A alta taxa de cruzamentos inicial indica que, como os animais estavam em um novo ambiente (caixas com listras ou sem listras verticais), no início da seção os animais estavam emitindo resposta de seu repertório de exploração do ambiente e que, no início da seção, a contingência entre o estímulo (choque) e resposta (cruzamento) estava sendo estabelecida, sendo que pode ter sido estabelecida por reforçamento negativo da inatividade, ou seja, o cessar à presença do choque coincide com a baixa atividade motora ou por punição da alta atividade motora (HUNZIKER, 2005).

4.4. Manova Geral

A Manova de medidas repetidas foi feita para avaliar a interação entre as condições experimentais e os tratamentos farmacológicos nas respostas dos animais agrupados nos Bts. Esta análise mostrou não haver interação entre os experimentos e os tratamentos nos BTs das respostas de esquiva ($F_{30,720} = 0,948$; $p > 0,05$), de fuga ($F_{30,720} = 0,819$, $p > 0,05$), de falhas ($F_{30,720} = 0,969$; $p > 0,05$), assim como nos cruzamentos ($F_{30,720} = 0,628$; $p > 0,05$) e na latência ($F_{30,720} = 0,937$; $p > 0,05$).

4.4.1. Discussão geral

Vários testes animais são utilizados para detectar efeitos antidepressivos e são baseados nas consequências comportamentais da exposição ao estresse incontrolável (PADOVAN; GUIMARÃES, 2004). Logo, desamparo aprendido é um de muitos modelos animais de depressão utilizados para o estudo da neurobiologia desse transtorno de humor (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003a). Dados da literatura mostram que mudanças comportamentais distintas podem ocorrer dependendo do momento em que é realizada a intervenção farmacológica (PADOVAN; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000; PADOVAN; GUIMARÃES, 2004).

Em nosso estudo é possível considerar a existência de uma conexão recíproca entre os NDR e NMnR. Nesse sentido, Mokler et al. (2009) mostraram que a infusão de glutamato no NDR aumenta 5-HT_{ext} no NMnR, enquanto a infusão no NMnR não altera o 5-HT_{ext} no NDR. O entendimento dessa conexão recíproca entre NMnR e NDR pode ser importante para entender o mecanismo da modulação da atividade da 5-HT nas diferentes áreas do encéfalo (MOKLER et al., 2009), assim como em condições que envolvam a adaptação a eventos aversivos.

Outra possível explicação seria que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ são co-expressos em muitos lugares no cérebro e estariam envolvidos na regulação de várias funções patológicas e fisiológicas (NAUMENKO et al., 2014). Além do mais, 5-HT₇ serve como auto ou heterorreceptor (junto com 5-HT_{1A}) na liberação de 5-HT nos núcleos da rafe, o que é, em parte, realizado pela neurotransmissão glutamatérgica (HARSING, 2006). Sendo assim, pode haver co-participação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ na liberação de serotonina na via NMnR-HD e essa regulação seria inibida por *feedback* negativo por neurônios glutamatérgicos. Com isso, em situações em que este sistema estaria alterado, como, por exemplo, após a exposição a eventos aversivos incontroláveis, o tratamento com antagonista de NMDAr promoveria uma adaptação a tais eventos. Esta hipótese encontra respaldo em resultados obtidos em nosso laboratório, no qual, utilizando diferentes modelos animais de depressão, observou-se que o tratamento com AP7 levou a uma atenuação dos efeitos comportamentais do nado forçado e do estresse de restrição.

5. CONCLUSÃO

Nossa hipótese de que a estimulação de receptores NMDA atenuaria e/ou reverteria o efeito do desamparo aprendido foi refutada;

Nenhum dos tratamentos farmacológicos causou mudanças comportamentais sem a exposição ao evento aversivo;

A exposição aos choques elétricos inescapáveis leva a alterações comportamentais quando o animal é novamente exposto vinte quanto horas depois, sendo os tratamentos pré ou pós choques elétricos inescapáveis.

Na condição experimental com os tratamentos após a exposição aos choques elétricos inescapáveis, nenhum tratamento foi eficaz em reverter o efeito de desamparo aprendido em ratos.

Na condição experimental com a administração dos tratamentos anteriormente à exposição do choque inescapável alterou o comportamento dos animais quando comparado com o controle experimental (estudo 3) nos tratamentos salina + salina. A ação do antagonismo de receptor de NMDA no NMnR nesta condição experimental teve efeito de aprendizagem de esquia.

Na condição experimental com ausência ao choque elétrico inescapável, não houve mudança comportamental entre os tratamentos. Sendo assim, o controle experimental mostrou-se eficaz, permitindo a comparação com os demais experimentos.

Houve indícios, porém não conclusivos, de que os tratamentos com antagonista (AP7) somente ou com posterior administração de antagonista NMDA pudessem reverter o quadro de desamparo aprendido.

6. REFERÊNCIAS

Referências¹

- ALMEIDA, P. V. G. et al. Role of serotonin 1A receptors in the median raphe nucleus on the behavioral consequences of forced swim stress. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 12, p. 1134–40, dez. 2013.
- ANDRADE, T. G. C. ; GRAEFF, F. . Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 70, n. 1, p. 1–14, set. 2001.
- ANTÔNIO, M.; TEIXEIRA, R. Melancolia e depressão : um resgate histórico e conceitual na psicanálise e na psiquiatria. **Revista de Psicologia da UNESP**, v. 4, n. 1, p. 41–56, 2005.
- AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 179, n. 3, p. 641–67, 1 jun. 1978.
- BHATIA, N. . N. N. . et al. Animal models in the study of stress: A review. **Journal of Pharmacy and Healthcare Management**, v. 02, p. 42–50, 2011.
- BUCKLEY, N. A.; FAUNCE, T. A. “Atypical” antidepressants in overdose: clinical considerations with respect to safety. **Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience**, v. 26, n. 8, p. 539–51, jan. 2003.
- CALIZO, L. H. et al. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 524–43, set. 2011.
- CAROBREZ, A. D. P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. Supl II, p. 52–58, 2003.
- CASSANO, P.; FAVA, M. Depression and public health: an overview. **Journal of psychosomatic research**, v. 53, n. 4, p. 849–57, out. 2002.
- DEAKIN, J. The origins of “5-HT and mechanisms of defence” by Deakin and Graeff: a personal perspective. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 12, p. 1084–9, dez. 2013.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 5, n. 4, p. 305–15, jan. 1991.
- GARTSIDE, S. E. et al. AMPA and NMDA receptor regulation of firing activity in 5-HT neurons of the dorsal and median raphe nuclei. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. April, p. 3001–3008, maio 2007.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 6023.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 3. ed. ed.São Paulo: Lemos Editorial, 1996.

HARSING, L. G. The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat. **Current neuropharmacology**, v. 4, n. 4, p. 313–39, out. 2006.

HOLTZHEIMER, P. E.; NEMEROFF, C. B. Advances in the treatment of depression. **NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 3, n. 1, p. 42–56, jan. 2006.

HORNUNG, J.-P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 26, n. 4, p. 331–343, dez. 2003.

HUNZIKER, M. H. L. O desamparo aprendido revisitado: estudos com animais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 21, n. 2, p. 131–139, ago. 2005.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Activation of post-synaptic 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Research**, v. 978, n. 1-2, p. 177–184, 18 jul. 2003a.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. Supl II, p. 46–51, dez. 2003b.

KENNETT, G. A.; DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. **Brain research**, v. 330, n. 2, p. 253–63, 25 mar. 1985.

KENNETT, G. A.; DOURISH, C. T.; CURZON, G. Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. **European journal of pharmacology**, v. 134, n. 3, p. 265–74, fev. 1987.

KINNEY, G. G.; KOCSIS, B.; VERTES, R. P. Injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane-anesthetized rat. **Brain research**, v. 654, n. 1, p. 96–104, 15 ago. 1994.

KNOLLMANN, L. L. B. | B. A. C. | B. C. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. ed.São Paulo: McGraw Hill Brasil, 2012. p. 2080.

M. MARCUS, M.T. YASAMY, M. OMMEREN, D. CHISHOLM, S. S. DEPRESSION: A Global Public Health Concern. **World Health Organization**, p. 6–8, 2012.

MAIER, S. F.; SELIGMAN, M. E. Learned helplessness: Theory and evidence. **Journal of Experimental Psychology: General**, v. 105, n. 1, p. 3–46, 1976.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 829–41, jan. 2005.

MCENTEE, W. J.; CROOK, T. H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. **Psychopharmacology**, v. 111, n. 4, p. 391–401, jan. 1993.

MEYER-BERNSTEIN, E. .; MORIN, L. . Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 267–279, ago. 1999.

MOKLER, D. J. et al. Functional interrelations between nucleus raphé dorsalis and nucleus raphé medianus: A dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. **Brain Research Bulletin**, v. 78, n. 4-5, p. 132–138, 16 mar. 2009.

MOREIRA, V.; FORTALEZA, U. DE. Experiências do estigma na depressão : um estudo transcultural. **Psico-USF**, v. 13, n. 2, p. 233–241, 2008.

MUNEOKA, K. et al. Differential levels of brain amino acids in rat models presenting learned helplessness or non-learned helplessness. **Psychopharmacology**, v. 229, n. 1, p. 63–71, set. 2013.

NAUMENKO, V. S. et al. Interplay between serotonin 5-HT1A and 5-HT7 receptors in depressive disorders. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 20, p. 582–590, 2014.

NEI, K. et al. NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. **Brain research**, v. 728, n. 1, p. 105–110, 22 jul. 1996.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, mar. 2002.

NETTO, S. M. et al. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 26, n. 6, p. 1135–41, out. 2002.

OWENS, M. J. et al. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1305–22, dez. 1997.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 325–330, out. 2000.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 1, p. 15–19, jan. 2004.

PATEL, V.; KLEINMAN, A. Poverty and common mental disorders in developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 8, p. 609–15, jan. 2003.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and Depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1003, n. 1, p. 250–272, nov. 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Second ed. Sidney, Australia: Elsevier, 1986. v. 10

RAMACHANDRAI, C. T. et al. Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more. **Indian journal of psychiatry**, v. 53, n. 2, p. 180–2, abr. 2011.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 140, p. 1–47, 2003.

RYAN, B. K. et al. Persistent inhibition of hippocampal long-term potentiation in vivo by learned helplessness stress. **Hippocampus**, v. 20, n. 6, p. 758–67, jun. 2010.

SELIGMAN, M. E.; BEAGLEY, G. Learned helplessness in the rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 88, n. 2, p. 534–41, fev. 1975.

SHUMAKE, J.; GONZALEZ-LIMA, F. Brain systems underlying susceptibility to helplessness and depression. **Behavioral and cognitive neuroscience reviews**, v. 2, n. 3, p. 198–221, set. 2003.

STAHL, S. M. **Psychopharmacology of Antidepressants**. London: Mosby, 1997.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Differential effect of NMDA on extracellular serotonin in rat midbrain raphe and forebrain sites. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 3, p. 1067–75, mar. 1996.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. **Brain Research**, v. 961, n. 1, p. 109–120, jan. 2003.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 407, n. 4, p. 555–82, maio 1999.

VOLLMAYR, B.; HENN, F. A. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. **Brain Research Protocols**, v. 8, n. 1, p. 1–7, ago. 2001.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 343–51, maio 2001.