

Alanny Bahia de Oliveira

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NMDA DE GLUTAMATO
NA ANSIEDADE EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA
PILOCARPINA**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Thereza
C.M. de Lima

Florianópolis, SC
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Alanny Bahia de
Envolvimento do receptor NMDA de glutamato na ansiedade
experimental induzida pela pilocarpina / Alanny Bahia de
Oliveira ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de
Lima - Florianópolis, SC, 2014.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Ansiedade. 4.
Pilocarpina. 5. Receptor NMDA. I. Lima, Thereza Christina
Monteiro de . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

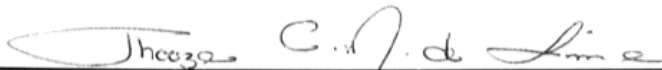
“Envolvimento do receptor NMDA de glutamato na ansiedade experimental induzida pela Pilocarpina.”

por

Alanny Bahía de Oliveira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 11/PPGFMC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientadora:



Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
(Presidente/Orientadora/FMC/CCB/UFSC)

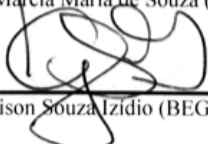
Banca examinadora:



Dr(a). Cíleré Lino de Oliveira (CFS/CCB/UFSC)

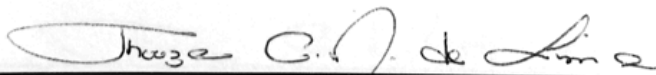


Dr(a). Márcia Maria de Souza (UNIVALI)



Dr(a). Geison Souza Izídio (BEG/CCB/UFSC)

Coordenadora:



Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 27 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me dar vida, saúde, paciência, força e sabedoria nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Sonir e Eude, pelo amor incondicional, pelo incentivo e apoio, pela paciência, pelos ensinamentos e cuidados. Muito obrigada! Obrigada também por sempre estarem dispostos a me ajudar, mesmo que isso envolvesse ir ao laboratório comigo. Obrigada por me ajudarem no momento em que mais precisei.

Ao meu irmão, Glauber, mesmo distante, pelos momentos de descontração, compreensão e pelo amor e carinho dado.

Ao meu noivo, Neto, pelo companheirismo, compreensão, suporte, por toda ajuda, paciência e amor. Seu carinho, cuidado e atenção foram essenciais.

À toda minha família e amigos por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus sogros, Argus e Mariza, e minha cunhada, Talita, por todo carinho, apoio, por me receberem como uma filha, e irmã.

À professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela oportunidade concedida ao me aceitar em seu laboratório, pela orientação e conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca examinadora, Professora Dra. Márcia Maria de Souza, Professora Dra. Cilene Lino de Oliveira, Professor Dr. Geison Souza Izídio, por terem sido tão solícitos ao aceitarem o convite, pela participação e sugestões incorporadas ao texto final.

À todos os colegas do laboratório de Neurofarmacologia pelo ótimo convívio diário, pela parceria, atenção e disposição para ajudar, discutir e contribuir para o meu trabalho. Em especial, gostaria de

agradecer aos colegas Evelyn, Renata e Vagner. De coração, muito obrigada!

Aos demais professores, funcionários e alunos do departamento de Farmacologia, por contribuírem, alguns de maneira indireta, para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

OLIVEIRA, A.B. **Envolvimento do receptor nmda de glutamato na ansiedade experimental induzida pela pilocarpina.** Florianópolis; 2014. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC].

A ansiedade é vista pela ciência moderna como um conjunto de comportamentos, com respostas endócrinas e fisiológicas, que objetivam proteger o indivíduo de possíveis ameaças. Um teste amplamente utilizado na pesquisa da ansiedade é o labirinto em cruz elevado (LCE), por ser simples, não requerer procedimentos estressantes e com sensibilidade bidirecional. Recentemente constatou-se que uma única injeção sistêmica de pilocarpina (PILO) – agonista não seletivo muscarínico – em doses não-convulsivantes induz um perfil ansiogênico em ratos avaliados 24h, 1 mês e até 6 meses após o tratamento. A fim de melhor entender os mecanismos que levam a esta alteração comportamental persistente, o presente trabalho buscou investigar o papel dos receptores NMDA, através do pré-tratamento e tratamento com MK-801, na modulação dos comportamentos relacionados à ansiedade. Ratos *Wistar* adultos machos foram tratados com PILO (150 mg/Kg i.p) e MK-801 (0,03 e 0,06 mg/Kg i.p.), e avaliados 24 h ou 30 dias após no LCE. A injeção de PILO promoveu efeitos ansiogênicos nos animais avaliados no teste do LCE, com uma diminuição do tempo gasto e número de entradas nos braços abertos do labirinto em comparação aos animais controle. O pré-tratamento, bem como o tratamento com antagonista, nas duas doses utilizadas, foram capazes de prevenir e bloquear, respectivamente, os efeitos ansiogênicos observados nos animais tratados com PILO 24h e 30 dias após o tratamento, havendo aumento no tempo e número de entradas nos braços abertos do labirinto e na incidência de comportamentos relacionados à avaliação de risco. Buscando melhor esclarecer o envolvimento dos receptores NMDA no modelo de ansiedade induzida pela pilocarpina, assim como as prováveis vias de ativação envolvidas, avaliou-se a participação do óxido nítrico (NO) por meio expressão das proteínas PSD-95 e nNOS. Os resultados obtidos mostram que os animais tratados com pilocarpina apresentaram diminuição da expressão de nNOS, efeito revertido pelo tratamento com antagonista. Os resultados demonstrados no presente estudo sugerem um papel importante dos receptores glutamatérgicos-NMDA numa interação sinérgica com os receptores

muscarínicos, mostrando que a modulação interativa entre esses dois sistemas neurotransmissores constitui um mecanismo importante no perfil ansiogênico desencadeado pela pilocarpina, bem como um provável envolvimento do NO na regulação da função dos receptores de NMDA na modulação dos estados ansiosos.

Palavras-chave: Pilocarpina; Ansiedade; Comportamento; Receptores NMDA.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A.B. **Involvement of the NMDA glutamate receptor in experimental anxiety induced by pilocarpine.** Florianópolis; 2014. [Master Thesis - Graduate Program in Pharmacology UFSC].

Modern science sees anxiety as a set of behaviors with endocrine and physiological responses that aim to protect the individual from possible threats. A test widely used in anxiety research is the elevated plus maze (EPM), for being simple and not require bidirectional sensitivity and stressful procedures. Recently it was found that a single systemic injection of pilocarpine (PILO) – a non-selective muscarinic receptor agonist - at non-convulsant doses induces an anxiogenic profile in rats evaluated 24h, 1 month and up to 6 months after treatment. In order to better understand the mechanisms that lead to this persistent behavioral change, this study investigated the role of NMDA receptors, through the pre-treatment and treatment with MK-801, in the modulation of anxiety-related behaviors. Adult male Wistar rats were treated with PILO (150 mg/kg, i.p.) and MK-801 (0.03 and 0.06 mg/kg, i.p.) and evaluated 24 h or 30 days later in the EPM. The injection of PILO promoted anxiogenic-like effects in animals evaluated in the EPM test, with a decrease in the time spent and number of entries on the open arms of the maze in comparison to control animals. The pre-treatment and treatment with antagonist, at both doses used, were able to block and prevent, respectively, the anxiogenic-like effects observed in PILO-treated animals 24 h and 30 days after the treatment, increasing the time spent and number of entries on the open arms of the maze and risk-assessment behaviors incidence. Seeking to clarify the involvement of NMDA receptors in the pilocarpine-induced anxiety model, as well as the likely activation pathways involved, we evaluated the role of nitric oxide (NO) through expression of PSD-95 and nNOS proteins. The results show that PILO-treated animals showed decreased nNOS expression, and this effect was reversed by the antagonist treatment. The results reported in this study suggested a major role of NMDA-glutamate receptors in a synergistic interaction with muscarinic receptors, showing that interactive modulation between these two neurotransmitter systems is an important mechanism in the anxiogenic-like behavior induced by pilocarpine, as well as a possible involvement of NO in regulating the function of NMDA receptors in the modulation of anxious states.

Keywords: pilocarpine; anxiety; behavior; NMDA receptors.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado, em animais pré-tratados com MK-801, 24 h ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.)..... 60
- Tabela 2. Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado, em animais tratados com MK-801 24 h e 30 dias após o tratamento..... 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classificação dos receptores colinérgicos muscarínicos baseada nas diferentes propriedades dos receptores acoplados a proteína G.	26
Figura 2. Receptores ionotrópicos (iGLUR) e metabotrópicos (mGLUR) do glutamato (GLU) e as composições das subunidades.....	30
Figura 3 Modelo do receptor NMDA.....	31
Figura 4. Labirinto em cruz elevado.	45
Figura 5. Protocolo experimental utilizado para avaliação dos efeitos do pré-tratamento com antagonista dos receptores NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da pilocarpina 24 h após tratamento com Pilocarpina.....	47
Figura 6. Protocolo experimental utilizado para avaliação dos efeitos do pré-tratamento com antagonista dos receptores NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da pilocarpina 30 dias após o pré-tratamento com o antagonista.	48
Figura 7. Protocolo experimental utilizado para avaliação dos efeitos da administração do antagonista dos receptores NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina 24 h após o tratamento com o antagonista.	49
Figura 8. Protocolo experimental utilizado para avaliação dos efeitos da administração do antagonista dos receptores NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina 30 dias após o tratamento.	49
Figura 9. Efeitos do pré-tratamento com MK-801 ou Salina em animais tratados com Salina ou Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) e avaliados no LCE 24 h.....	54
Figura 10. Efeitos do pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 24.....	55

Figura 11. Efeitos do pré-tratamento com MK-801 (0,03 mg/kg) ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento.....	56
Figura 12. Efeitos do pré-tratamento com antagonista MK-801 (0,03 mg/kg) do receptor NMDA ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após.....	57
Figura 13. Efeitos do pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento	58
Figura 14. Efeitos do pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento	59
Figura 15. Efeitos do tratamento com MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 24 h após o tratamento com o agonista muscarínico.....	61
Figura 16. Efeitos da administração do antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 24 h após o tratamento com o agonista muscarínico.....	62
Figura 17. Efeitos da administração do antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento com o agonista muscarínico	63
Figura 18. Efeitos da administração do antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento com o agonista muscarínico	64
Figura 19. Efeitos da administração de Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) e MK-801 (0,06 mg/Kg, i.p.) na expressão de nNOS no córtex e hipocampo de ratos 24h e 30 dias após o pré-tratamento com o agonista muscarínico.....	66

Figura 20. Efeitos da administração de Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) e MK-801 (0,06 mg/Kg, i.p.) na expressão de PSD-95 no córtex e hipocampo de ratos 24h e 30 dias após o pré-tratamento com o agonista muscarínico.....	67
Figura 21. Esquema do mecanismo de ação sugerindo a participação do NO na regulação dos efeitos ansiogênicos promovidos pela Pilocarpina.	77

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

7-NI	7-nitroindazol
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AP7	Ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CRF	Hormônio liberador de corticotropina
DMS	Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DR	Núcleo dorsal da rafe
EBA	Entrada nos braços abertos
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GLU	Glutamato
GluRs	Receptores glutamatérgicos
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
L-NAME	Éster de N-metil-arginina
LCE	Labirinto em cruz elevado
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801	Dizocilpina
MPFC	Córtex medial pré-frontal
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
P	Pré-tratamento
PILO	Pilocarpina
PSD-95	Proteína de densidade pós-sináptica 95
RmACh	Receptores muscarínicos de acetilcolina
RnACh	Receptores nicotínicos de acetilcolina
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Tratamento
TBA	Tempo nos braços abertos
TRIM	1-(2-trifluorometilfenil) imidazol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1.	ANSIEDADE.....	21
1.2.	O SISTEMA COLINÉRGICO.....	26
1.3.	RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	28
1.4.	A PESQUISA NA ANSIEDADE.....	33
2.	HIPÓTESES	38
3.	OBJETIVOS	41
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	43
4.2.	ANIMAIS.....	43
4.3.	DROGAS.....	44
4.4.	TESTE COMPORTAMENTAL.....	45
4.4.1	Labirinto em Cruz Elevado	45
4.5.	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	47
4.5.1	Pré-tratamento com MK-801	47
4.5.1.1	Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com MK-801 24 h ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina.....	47
4.5.2	Tratamento com MK-801	48
4.5.2.1	Avaliação dos efeitos do tratamento com MK-801 24 h ou 30 dias após o pré-tratamento com Pilocarpina.....	48
4.6.	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	50
4.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5.	RESULTADOS	53
5.1.	PRÉ TRATAMENTO COM MK-801.....	53
5.1.1.	Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com MK-801 24 h ou 30 dias após o tratamento com pilocarpina	53
5.2.	TRATAMENTO COM MK-801.....	60
5.2.1.	Avaliação dos efeitos da administração de MK-801 24 h e 30 dias após o pré-tratamento com Pilocarpina	60
5.3.	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	65

6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – Aprovação de projeto de mestrado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANSIEDADE

O conceito de ansiedade parece ser uma construção constante no decorrer da história humana, por resultar de relatos que ocorrem com frequência na vida cotidiana. Durante o século 18 o termo ansiedade foi utilizado pela primeira vez no campo da medicina para se referir a um estado de doença mental, sendo em seguida compreendida em termos físicos. Deste ponto de vista, a ansiedade foi considerada uma patologia somática. No século 19, o diagnóstico de ansiedade começou a diferir entre os autores, que utilizavam critérios vagos e diversificados. Entretanto, Emil Kraepelin realizou um trabalho fundamental neste período, onde desenvolveu um sistema de classificação dos transtornos mentais, conforme suas causas e sintomas. As teorias de Kraepelin predominaram o campo da psicologia até o início do século 20, quando Adolf Meyer as rejeitou e introduziu um novo sistema de classificação, propondo que o funcionamento da mente humana dependia de uma combinação de esforços biológicos e psicológicos para se adaptar ao mundo (Antony *et al.*, 2009).

A ansiedade é vista pela ciência moderna como um conjunto de comportamentos, com respostas endócrinas e fisiológicas, que objetivam proteger o indivíduo de possíveis ameaças. Embora essas respostas transmitam um claro valor adaptativo, quando expressas de maneira excessiva ou até mesmo na ausência de estímulos ameaçadores podem caracterizar uma doença grave. Em sua configuração “não-patológica”, a ansiedade pode ser dividida em duas classes, a primeira é a ansiedade estado, que depende do ambiente, se refere a adaptações afetivas para

situações específicas, é considerada um estado de ansiedade aguda, e a segunda é a ansiedade traço, que é um estado de ansiedade a longo prazo, refe-se às características afetivas de uma pessoa através do tempo e da situação (Gross & Hen, 2004; Sylvers *et al.*, 2011). A ansiedade traço demonstra ser resultante de um circuito hipersensível de avaliação, onde a hipervigilância e o alerta persistentes parecem resultar da superestimação do potencial de ameaça em situações ambíguas (Sylvers *et al.*, 2011).

Dentre os fatores envolvidos nas definições de ansiedade, a excitação biológica ou manifestações autonômicas e musculares, a redução na eficiência comportamental, respostas de esquiva e/ou fuga, bem como relatos verbais de estados internos desagradáveis, têm sido apontados como elementos comuns (Kanfer & Phillips, 1970).

Alguns autores definem a ansiedade como um estado emocional desagradável, voltado para o futuro, que guarda relação com outra emoção, o medo e é, às vezes, considerado desproporcional a uma ameaça real (Banaco & Zamignani, 2004). Embora nem todas as opiniões converjam, o medo é geralmente tido como uma reação a um estímulo ameaçador explícito, com a fuga ou evitação da proximidade, enquanto que a ansiedade é geralmente considerada um estado mais geral de angústia, duradouro, solicitado por estímulos menos explícitos ou mais generalizados, envolvendo excitação fisiológica, mas muitas vezes sem um comportamento funcional organizado (Lang *et al.*, 2000).

McNaughton e Corr (2004) estabeleceram a teoria comportamental do sistema defensivo, onde o medo e a ansiedade distinguem-se a partir das respostas defensivas. Segundo esta teoria, reconhecer a ameaça é necessário, mas não suficiente para diferenciar o

medo da ansiedade, pois a motivação direcional do comportamento é principal diferença entre estes dois estados. Neste contexto, o medo foi descrito como uma reação defensiva, no qual as respostas de luta, fuga ou congelamento facilitam a evasão do ambiente aversivo, enquanto a ansiedade foi descrita como uma hipervigilância incidente durante o período de aproximação de uma ameaça em potencial. O medo é considerado um dos principais precursores normais durante o desenvolvimento de transtornos de ansiedade patológicos (Rosen & Schulkin, 1998).

Quando um animal é confrontado com o perigo, ameaça ou uma situação aversiva, uma resposta adaptativa ao medo é provocada e, em seguida, desaparece quando a aversão diminui. Por exemplo, falar em público normalmente provoca algum medo, ou comportamentos de ansiedade, que desaparecem conforme o andamento ou conclusão da apresentação, diferentemente dos transtornos de ansiedade patológicos nos quais as respostas emocionais são cronicamente disfuncionais. Pessoas com fobia de falar em público terão uma reação autônoma, cognitiva e somática grave e debilitante quando simplesmente for sugerido uma apresentação pública.

Os transtornos causados pela ansiedade referem-se a um conjunto de emoções persistentes, capazes de interferir no funcionamento fisiológico. Conforme Banaco e Zamignani (2004), a ansiedade define-se enquanto fenômeno clínico de três maneiras: (1) quando implica em um comprometimento ocupacional do indivíduo, impedindo o bom andamento de suas atividades profissionais, sociais e acadêmicas; (2) quando envolve um grau de sofrimento considerado pelo indivíduo como significativo e (3) quando as respostas de evitação

e eliminação passam a ocupar um tempo considerável do dia.

A primeira classificação americana para os transtornos mentais ocorreu em 1918, no *Statistical Manual*, porém diversos tipos de psicopatologias, incluindo a ansiedade, vieram a constar neste manual somente na décima edição. Dando continuidade neste desenvolvimento, o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), elaborado pela *American Psychiatric Association*, foi publicado em 1952 e hoje é o padrão de classificação dos transtornos mentais utilizado pelos profissionais de saúde mental nos Estados Unidos. Composto por alguns componentes principais – classificação diagnóstica, conjuntos de critérios diagnósticos e texto descritivo – o DSM atualmente encontra-se em sua quarta edição (DSM-IV), projetada para uso em situações clínicas com populações da comunidade. E, recentemente (abril 2012), foi revisada (DSM-V), trazendo pequenas alterações formais e uma nova classificação. Conforme o DSM-V os transtornos de ansiedade são classificados como: 00. Transtorno de ansiedade de separação; 01. Pânico; 02. Agorafobia; 03. Fobia específica; 04. Ansiedade social; 05. Ansiedade generalizada; 06 - 11. Ansiedade induzida por substâncias; 12. Ansiedade atribuída a outras condições médicas; 13. Ansiedade não especificada em outra categoria e ataque de pânico (Craske, 2003; *American Psychiatric Association*, 2012). Juntos, esses distúrbios afetam mais de 20% da população em algum momento de sua vida, geralmente em indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, ocorrendo com uma incidência 2,5 vezes maior em mulheres (Gross & Hen, 2004; Wittchen & Jacobi, 2005; Wittchen *et al.*, 2011).

No que diz respeito a terapêutica da ansiedade, além dos benzodiazepínicos, vários outros fármacos são comumente empregados

na clínica, tais como a buspirona, os antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, anti-histamínicos, antipsicóticos em baixas doses, além dos fitoterápicos (Griebel & Holmes, 2013).

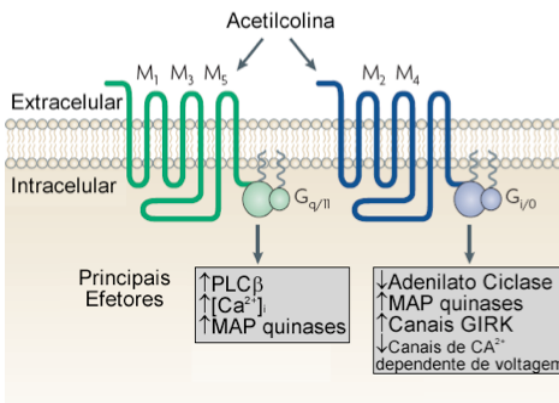
Vários sistemas de neurotransmissão estão envolvidos na gênese dos transtornos de ansiedade, bem como no seu tratamento. O sistema GABAérgico é um dos sistemas mais evidenciado como modulador destes transtornos. Drogas que melhoram a transmissão GABAérgica, como, por exemplo, os benzodiazepínicos, apresentam efeito ansiolítico, enquanto que, drogas que diminuem esta transmissão, “precipitam” a ansiedade (Numeroff, 2003; Möhler, 2012). Além deste sistema, outros sistemas foram descobertos por participarem da regulação dos transtornos de ansiedade, tais como o glutamatérgico, o serotoninérgico, o noradrenérgico, o dopaminérgico, e também alguns neuropeptídios (Bergink *et al.*, 2004).

Grande parte do conhecimento sobre a neurobiologia da ansiedade têm sido organizado através de modelos cognitivos-emocionais, como proposto por Gray (1982). Inúmeras regiões encefálicas estão envolvidas na regulação dos estados de ansiedade, dentre os principais circuitos cerebrais estão a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal. Conforme postulado por Gray (1982) e Gray e Mcnaughton (2000) o sistema septo hipocampal tem função primordial na regulação da ansiedade, pois ele engatilha respostas frente a situação de conflito, caracterizadas pela interrupção de um comportamento e aumento dos níveis de alerta e atenção. Por exemplo, a aproximação ou evitação à um estímulo potencialmente aversivo.

1.2. O SISTEMA COLINÉRGICO

A acetilcolina exerce suas funções fisiológicas através da ligação e ativação de duas famílias distintas de receptores: os receptores nicotínicos de acetilcolina (RnACh), ligados a canais iônicos (ionotrópicos) e os receptores muscarínicos de acetilcolina (RmACh), que são acoplados a proteína G (metabotrópicos), ambos pré e pós sinápticos, onde regulam a excitabilidade neuronal, transmissão e plasticidade sináptica. Os RmACh são distinguidos em cinco subtipos (M1-M5), que são subdivididos em duas classes funcionais, de acordo com sua preferência de ligação a proteína G. Os receptores M1, M3 e M5 acoplam-se seletivamente as proteínas G da família Gq/G11, enquanto que os receptores M2 e M4 ativam preferencialmente as proteínas da família Gi/Go, conforme mostrado na figura 1 (Cobb & Davies, 2005; Wess *et al.*, 2007).

Figura 1 Classificação dos receptores colinérgicos muscarínicos baseada nas diferentes propriedades dos receptores acoplados a proteína G (adaptado de Wess *et al.*, 2007).



Cada um dos cinco subtipos exibe um padrão distinto de distribuição, sendo expressos em muitas regiões do SNC, bem como em tecidos periféricos. Os receptores M1, M4 e M5 são predominantemente expressos no SNC, enquanto que os subtipos M2 e M3 são amplamente distribuídos tanto no SNC, quanto nos tecidos periféricos (Wess *et al.*, 2007).

Os receptores muscarínicos regulam diversas funções centrais importantes, incluindo processos cognitivos, comportamentais, sensoriais, motores e autonômicos (Felder *et al.*, 2000; Eglen, 2005).

As aferências colinérgicas se projetam em regiões límbicas vitais para o controle da ansiedade. O septo e o hipocampo atuam em consonância para controlar a ansiedade (Gray, 1982; Gray & Mcnaughton, 2000), e estudos tem indicado que os sistemas hipocampal colinérgico e GABAérgico septal agem sinergicamente na modulação da ansiedade (Menard & Treit, 2001; Degroot & Treit, 2003).

As vias pelas quais o hipocampo e o septo interagem para modular a ansiedade ainda não são bem determinadas, porém foi constatado que o glutamato intra-septal reverte os efeitos ansiolíticos da administração intra-hipocampal de midazolam, sugerindo uma possível estratégia de estudo a esse respeito (Menard & Treit, 2001).

A Pilocarpina, um alcaloide derivado do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), um arbusto oriundo do Brasil, e apresenta ação agonista colinérgica muscarínica. Na clínica é comumente para o tratamento de glaucoma, por reduzir a pressão intraocular (Pinheiro, 2002). Em modelos experimentais, a pilocarpina quando administrada em altas doses promove episódios comportamentais de ordem epileptogênica até que se estabeleça um *status epilepticus* caracterizado por crises

espontâneas e recorrentes (Leite *et al.*, 1990). Estudos com doses não-convulsivantes ou que avaliem ratos não-epilépticos tratados com pilocarpina ainda são escassos. Na literatura encontramos, por exemplo, o estudo com ratos não-epilépticos de De Mello e Carobrez (2005), no qual se comprovou que uma única dose de pilocarpina é capaz de prevenir deficiências de aprendizado relacionadas à idade até 24 meses após um único tratamento sistêmico com este agonista colinérgico. Além disso, sabe-se também que doses convulsivantes de Pilocarpina promovem a liberação de glutamato, e subsequente ativação dos receptores NMDA (Cavalheiro, 1995).

1.3. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Numerosas revisões encontram-se disponíveis sobre os receptores glutamatérgicos (GluRs) no sistema nervoso central (SNC), seus papéis funcionais, bem como suas implicações na fisiopatologia da lesão neural e distúrbios neuropsiquiátricos (Miller *et al.*, 1996; Hollmann & Heinemann, 1994; Schoepp, 1994; Asztely & Gustafsson, 1996; Conn & Pin, 1997; Dingledine *et al.*, 1999).

Os receptores glutamatérgicos são classificados em ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs), conforme seus acoplamentos intra e extracelular, e diferentes características farmacológicas e bioquímicas (Schoepp, 1994; Miller *et al.*, 1996).

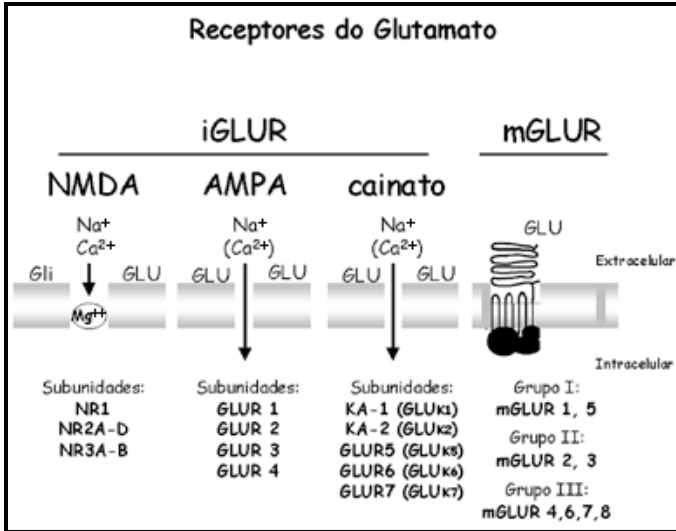
A classe de receptores ionotrópicos é subdividida conforme os agonistas que se ligam seletivamente a estes receptores, sendo eles: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxazolepropionico (AMPA) e cainato (Hollmann & Heinemann, 1994; Meldrum, 2000). Os canais de membrana associados com estes receptores exibem propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas variadas, incluindo a seletividade para os canais iônicos de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{+2}). Os iGluRs são codificados por várias famílias de genes: a família AMPA é constituída por GluR 1-4, a família Cainato composta de GluR 5-7 e Ka 1-2, e a família NMDA com as subunidades NMDA-R1 NMDA-R2 A-D e NMDA-R3 A-B (figura 2) (Miller *et al.*, 1996; Hollmann & Heinemann, 1994; Schoepp, 1994; Asztely & Gustafsson, 1996; Conn & Pin, 1997; Dingledine *et al.*, 1999).

Os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G e classificados em oito classes (mGLU1-8), e subdivididas em três grupos (I, II e III), conforme mostrado na figura 2. Estes receptores exercem os seus efeitos, quer nos segundos mensageiros ou canais de íons, através da ativação das proteínas de ligação GTP que regulam a síntese de diferentes segundos mensageiros intracelulares, tais como cAMP, IP3 ou cGMP (Hollmann & Heinemann, 1994; Pin e Duvoisin, 1995).

Apesar de serem distribuídos por todo o cérebro, os diferentes tipos de receptores ionotrópicos de glutamato apresentam variabilidade regional e funcional. Habitualmente, a densidade dos receptores de NMDA é elevada na região cortical. A distribuição dos receptores de AMPA e cainato é semelhante a que é exibida pelo receptor de NMDA, em conformidade com a sua ação como um par funcional. A localização desses receptores é responsável por seus efeitos sobre a cognição, a percepção e o humor (Krystal *et al.*, 1999).

Figura 2. Receptores ionotrópicos (iGLUR) e metabotrópicos (mGLUR) do glutamato (GLU) e as composições das subunidades (retirado de Carobrez, 2003).

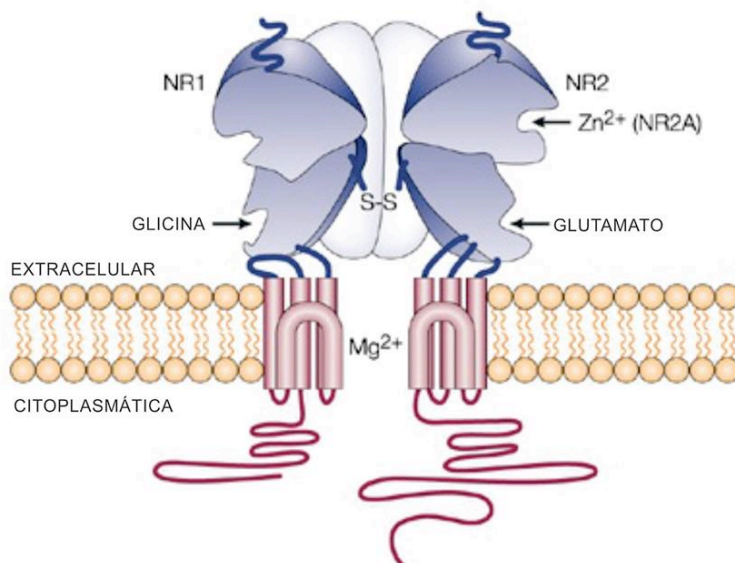


Na década de 1980, tornou-se evidente que o glutamato também age sobre a classe de receptores não-ionotrópicos ou receptores acoplados à proteína G, conhecida principalmente como “receptores metabotrópicos” (Pin e Duvoisin, 1995). Estes receptores estão presentes tanto em locais pré-sinápticos como pós-sinápticos. Os subtipos de receptores metabotrópicos também são diferencialmente distribuídos dentro do SNC (Ohishi *et al.*, 1993), o que reflete a diversidade de funções nos processos normais e patológicos, e exercem ações de longa duração através da ativação e inibição de sinais intracelulares (Bergink *et al.*, 2004).

O complexo canal do receptor NMDA (figura 3) possui várias

características. Existem vários sítios reguladores, sendo que três destes sítios - neurotransmissor glicina, da poliamina e o de zinco - estão fora do canal iônico e são de natureza excitatória. Já os sítios moduladores inibitórios estão localizados no interior do canal iônico. Assim, para que se tenha um funcionamento neuronal normal é necessário uma modulação precisa (Bergink *et al.*, 2004).

Figura 3 Modelo do receptor NMDA (adaptado de Kemp & Mckernan, 2002).



O receptor NMDA desempenha um papel tanto nos processos emocionais como cognitivos. Diversas observações sustentam o interesse no papel destes receptores no controle de estados ansiosos, dentre elas podemos destacar: o papel dos receptores NMDA na amígdala nos processos cognitivos subjacentes ao medo condicionado (Walker & Davis, 2000; Bauer *et al.*, 2002); a influência acentuada e

moduladora dos receptores NMDA sobre a atividade das vias monoaminérgicas (Takahata e Moghaddam, 1998; Morrow *et al.*, 2000; Del Arco & Mora, 2001; Adell *et al.*, 2002); a influência dos receptores NMDA sobre a liberação do neuropeptídeo ansiogênico CRF (Cratty & Birkle, 1999); semelhanças comportamentais de antagonistas dos receptores NMDA e agonistas GABAérgicos (Willetts *et al.*, 1990); evidências para interações funcionais, de curto e longo prazo, entre receptores NMDA e benzodiazepínicos na modulação dos estados de ansiedade (Sharma & Kulkarni, 1993; Smith e Dudek, 1996; De Souza *et al.*, 1998; Przegalinski *et al.*, 2000; Allison & Pratt, 2003).

Estudos na neurobiologia da ansiedade têm destacado o glutamato, principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, como um elemento importante na ansiedade e no comportamento ansioso (Bergink *et al.*, 2004). Sabe-se que uma alteração na transmissão glutamatérgica esta implicada nos sintomas afetivos e mnemônicos de vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos, incluindo estados ansiosos (Carlsson & Carlsson, 1990; Schwendt & Jezova, 2000; Moghaddam, 2002).

A função do sistema de glutamato na regulação da excitabilidade neuronal em estruturas cerebrais como a amígdala, o hipocampo, ou córtex, é importante para as respostas de ansiedade. Tratamentos farmacológicos que melhoram a excitabilidade dos neurônios de saída na amígdala basolateral favorecem o condicionamento aversivo. Alternativamente, os tratamentos que diminuem a excitabilidade desses neurônios produzem efeitos ansiolíticos (LeDoux, 1994; Maren, 1996). De fato, tem sido mostrado que a administração de antagonistas dos receptores glutamatérgicos do

tipo NMDA reduz a ansiedade em modelos animais (Miserandino et al, 1990; Kim & McGaugh, 1992). Está cada vez mais evidente que a sinapse de glutamato é um alvo potencial para a intervenção farmacológica em uma ampla gama de distúrbios neurológicos e psiquiátricos.

1.4. A PESQUISA NA ANSIEDADE

Modelos animais são ferramentas essenciais e amplamente utilizadas na pesquisa de diversas patologias. Eles permitem a exploração de mecanismos moleculares, descoberta de potencial terapêutico e eficácia de intervenções terapêuticas, descoberta de doses e margem de segurança para potenciais fármacos, dentre outros. Porém, existem algumas limitações na utilização destes modelos, como falsos positivos e/ou negativos, dados inconclusivos, além do desafio de reproduzir e/ou modelar complexas doenças humanas em animais, principalmente quando se trata de doenças relacionadas ao sistema nervoso central. Mesmo diante dos desafios, os modelos de comportamento para a maioria dos distúrbios do SNC têm sido cada vez mais aprimorados e fornecido valiosas informações (McGonigle, 2014; McGonigle & Ruggeri, 2014).

Um modelo animal para ser útil deve possuir validade. Os tipos de validade mais comumente empregados são validade de face, a qual exige manifestação de sintomas semelhantes ao do quadro clínico, validade teórica, onde o modelo deve reproduzir os mecanismos biológicos semelhantes à doença, e validade preditiva, que requer a

capacidade de resposta a agentes terapêuticos clinicamente eficazes. Em geral, os modelos animais para doenças do SNC possuem validade preditiva (Belzung & Lemoine, 2011; Cryan & Sweeney, 2011; McGonigle & Ruggeri, 2014).

Os modelos animais de ansiedade podem ser não-condicionados ou condicionados, e são geralmente classificados em 3 categorias principais: testes de conflito, que combinam um comportamento natural, como comer e beber, com um estímulo aversivo como o choque (por exemplo, o teste de vogel); testes cognitivos, que utilizam o condicionamento clássico para treinar um animal a associar um estímulo neutro com um estímulo desagradável (por exemplo, o medo condicionado); e testes etológicos, que normalmente combinam um comportamento que é naturalmente motivado no animal, como a exploração de um novo ambiente, com um estímulo aversivo, como lugares claros e abertos, gerando assim o conflito ou ansiedade (por exemplo, o labirinto em cruz elevado) (Cryan & Sweeney, 2011; McGonigle, 2014).

Um fator limitante na pesquisa da ansiedade é a ausência de análogos comportamentais em animais. Em decorrência da ansiedade ser um conceito que descreve um estado subjetivo, ela é considerada uma característica humana, podendo assim, na melhor das hipóteses, ser apenas modelada e não reproduzida em animais (Martin, 1998). Segundo Andreatini e colaboradores (2001) modelos animais de ansiedade úteis devem primeiramente reproduzir características comportamentais e patológicas da ansiedade; bem como permitir a investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem e por fim, possibilitar uma avaliação confiável de agentes

ansiolíticos, assim como identificar efeitos ansiogênicos de drogas e toxinas.

Entre os principais testes utilizados na pesquisa e descoberta de medicamentos ansiolíticos estão o campo aberto; a interação social em ratos; a vocalização ultrassônica; a transição claro-escuro; o medo condicionado; o teste de Vogel, a interação presa-predador; o labirinto em cruz elevado; os testes de conflito; e o estresse induzido por hipotermia (Griebel & Holmes, 2013).

O labirinto em cruz elevado (LCE), desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado inicialmente para ratos por Pellow e colaboradores (1985), é um dos testes mais amplamente utilizado como ferramenta na investigação da base psicológica e neuroquímica da ansiedade por se tratar de um teste com *design* simples, econômico, rápido, com sensibilidade bidirecional e não requerer procedimentos estressantes como a privação de alimentos, água ou o uso de choque elétrico (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers & Cole, 1994; Carobrez & Bertoglio, 2005).

O teste do LCE baseia-se na aversão natural dos roedores para espaços abertos, bem como o comportamento exploratório e utiliza conflito entre a exploração e aversão. Os animais quando expostos ao LCE demonstram um padrão de comportamento caracterizado por evitar os braços abertos com maior preferência para os braços fechados. Esta tendência é suprimida por ansiolíticos e potencializada por agentes ansiogênicos (Griebel & Holmes, 2013). As medidas de ansiedade avaliadas são o número de entradas nos braços abertos (frequência) e o tempo, expresso como porcentagem da quantidade de tempo gasto nos braços abertos (Rodgers *et al.*, 1997; Bourin *et al.*, 2007). Outros

parâmetros etológicos também são avaliados a fim de garantir que não haja alterações no comportamento apresentado no LCE. Essas medidas incluem o estiramento corporal (*stretched attend posture – SAP*), retorno ao braço fechado, levantamento (*rearing*), imersão de cabeça (*head dipping*) protegida e desprotegida (Lister, 1987; Cole & Rodgers, 1994; Rodgers *et al.*, 1997).

Ansiolíticos clássicos, tais como os benzodiazepínicos, têm sido utilizados para validar farmacologicamente uma variedade de modelos, por apresentarem início de efeito rápido. Ademais, esses fármacos são utilizados como padrão de comparação para novos compostos propostos como efetivos para o controle da ansiedade. Contudo, o fato de diversos transtornos de ansiedade serem resistentes ao tratamento com benzodiazepínicos demonstra a relevância da pesquisa de novos agentes, bem como aponta a necessidade da utilização de outras classes de medicamentos para a validação farmacológica de modelos animais. Assim, uma estratégia atual baseia-se no desenvolvimento de novos modelos específicos para cada transtorno de ansiedade ou na reavaliação dos modelos já existentes, correlacionando-os a determinado transtorno (Andreatini *et al.*, 2001).

Fundamentados no fato de que pouca atenção tem sido dada as mudanças que ocorrem em resposta as doses não-convulsivantes de drogas que potencialmente podem ser ansiogênicas, bem como, no desenvolvimento de novos modelos específicos para cada transtorno de ansiedade, ou revalidação de modelos já existentes, o grupo de Neurofarmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina vêm investigando os efeitos comportamentais, de curto e longo prazo, induzidos pela pilocarpina. Estes estudos mostraram que uma única

injeção sistêmica de pilocarpina na dose de 150 mg/kg induz comportamentos de longa duração, que levam a um perfil ansiogênico em ratos. Assim, foi proposto seu uso como um modelo para avaliar a ansiedade-traço, em contraste com os testes disponíveis que modelam a ansiedade-estado (Duarte, Gavioli *et al.*, 2010; Duarte, Duzzioni *et al.*, 2013).

Recentemente, dados obtidos por Hoeller (2013) mostraram que a expressão das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA do hipocampo de ratos estavam diminuídas 24h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina, sugerindo que a ativação de receptores muscarínicos (possivelmente o subtipo M1, devido sua alta densidade nas regiões límbicas, sendo estes 60% daqueles localizados no hipocampo) pode modificar os níveis de ansiedade dos ratos tratados através de alterações plásticas (via receptores NMDA) e, conseqüentemente, a excitabilidade celular hipocampal. Os efeitos ansiolíticos observados a partir da ação de antagonistas do receptor NMDA parecem refletir o bloqueio desses receptores no hipocampo.

A atuação do glutamato sobre os receptores NMDA no sistema nervoso central ativa a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOs), resultando na formação de óxido nítrico (NO) (Garthwaite *et al.*, 1988; Garthwaite & Boulton, 1995). A ativação dos receptores NMDA leva ao influxo de Ca^{2+} , que se liga a calmodulina, e este complexo estimula a enzima nNOS e, conseqüentemente, produção de NO. Nos últimos anos, muitas descobertas eletrofisiológicas e bioquímicas sugeriram que o NO modula a função sináptica neuronal no sistema nervoso central (Prast & Philippu, 2001). A produção de NO por nNOS correlaciona-se exclusivamente com a ativação dos receptores NMDA (Garthwaite &

Boulton, 1995) e Brenman e Brecht (1997) elucidaram esta correlação ao relatarem que a nNOS está ligada aos receptores NMDA através de uma proteína de densidade pós-sináptica, a PSD-95.

2. HIPÓTESES

- O bloqueio prévio dos receptores glutamatérgicos NMDA é capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos desencadeados pela administração sistêmica de Pilocarpina;
- O bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA, após a administração sistêmica de Pilocarpina, é capaz de reverter os efeitos ansiogênicos desencadeados pelo tratamento com Pilocarpina;
- A via de produção de NO pela enzima nNOS é uma possível via de sinalização responsável pela modulação dos estados ansiosos produzidos pelo tratamento com Pilocarpina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA na ansiedade induzida por uma única injeção sistêmica de uma dose não convulsivante de Pilocarpina no LCE.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da neurotransmissão glutamatérgica na ansiedade induzida por Pilocarpina através do pré-tratamento com MK-801, 24 h ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina;
- Investigar o efeito da neurotransmissão glutamatérgica na ansiedade induzida por Pilocarpina através do tratamento com MK-801, 24 h ou 30 dias após o pré-tratamento com Pilocarpina;
- Investigar a expressão de proteínas envolvidas nas possíveis vias de ativação dos receptores NMDA no modelo de ansiedade traço induzido pela Pilocarpina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos conforme os padrões internacionais do bem-estar animal e recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram delineados de tal maneira a minimizar o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extraído o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com os protocolos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número PP 798 (anexo A).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* com idade entre 2 a 3 meses, pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram alojados em grupos de 5 por caixa plástica padrão (36 x 30 x 15 cm), com livre acesso à água e à comida. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de luz claro/escuro de 12h, com início às 07:00h. Os ratos foram transferidos e alojados para o biotério laboratorial 7 dias antes da realização dos experimentos, para habituação às condições laboratoriais.

4.3 DROGAS

Todas as drogas foram dissolvidas em salina (0,9 %) e injetadas em um volume de 1 mL/kg. As doses utilizadas para a realização deste trabalho foram baseadas na literatura ou em padronizações prévias do laboratório (Pellow & File, 1986; Hoeller, 2011; Duarte, Duzzioni *et al.*, 2013).

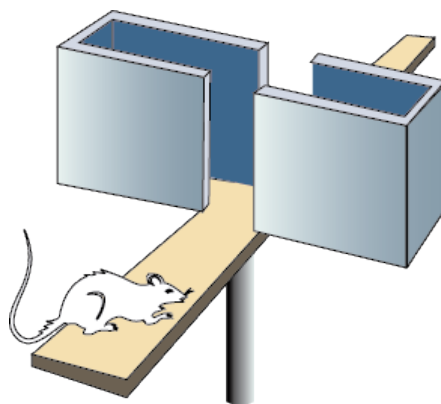
- Solução Salina (NaCl 0,9 %) - Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA - injetada por via intraperitoneal nos grupos controle;
- Hidrocloreto de Pilocarpina (agonista muscarínico não-seletivo) – Sigma-Adrich Co., St. Louis, MO, EUA. Injetado via intraperitoneal na dose de 150 mg/kg.
- Brometo de Metil-escopolamina (antagonista muscarínico que não cruza a barreira hemato-encefálica) – RBI, EUA - injetado por via subcutânea na dose de 1 mg/Kg, 30 minutos antes da pilocarpina com o intuito de prevenir os efeitos colinomiméticos periféricos do agonista muscarínico.
- MK-801 (antagonista do receptor NMDA) - Sigma-Adrich Co., St. Louis, MO, EUA – injetado por via intraperitoneal nas doses de 0,03 e 0,06 mg/Kg, 30 min antes e 24 h ou 30 dias depois do agonista muscarínico pilocarpina.

4.4 TESTE COMPORTAMENTAL

4.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste utilizado para mensurar respostas vinculadas à ansiedade em animais (figura 4). O aparato foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado inicialmente para ratos por Pellow et al. (1985). O LCE (EP151, Insight Ltda. Ribeirão Preto, SP, Brasil) consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 cm) de madeira, opostos em forma de cruz e elevados a 40 cm do chão. Os braços estão conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). Com intuito de prevenir a queda dos animais, os braços abertos são circundados por barras laterais de 1 cm de altura. O aparato foi alocado em uma sala iluminada com luz vermelha (15 W) com intensidade de 3 lux no assoalho do equipamento.

Figura 4. Labirinto em cruz elevado (adaptado de Griebel & Holmes, 2013).



Ao início do teste, os animais foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi avaliado durante 5 min (Pellow, *et al.*, 1985). Foram registradas as medidas comportamentais como tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como parâmetros etológicos de avaliação de risco como imersões de cabeça desprotegidas (*unprotected head-dipping*), estiramentos corporais protegidos (*protected stretch-attend postures*), comportamento de levantar (*rearing*), afim de aumentar a sensibilidade do teste (Rodgers & Cole, 1994; Rodgers & Dalvi, 1997).

O aparato foi limpo com solução de etanol 10 % entre cada sessão. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100.

De maneira semelhante, foi calculada a porcentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Para os demais parâmetros observados, fez-se a soma simples das frequências obtidas.

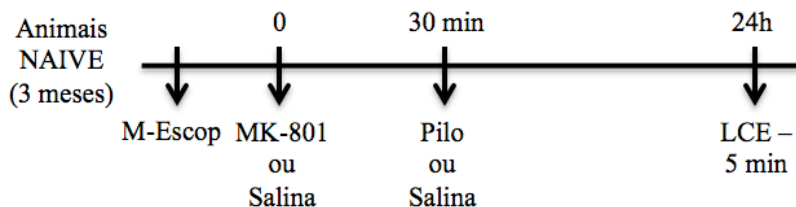
4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 Pré-tratamento com MK-801

4.5.1.1 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com MK-801 24 h ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina

Os animais de 90 dias foram divididos em quatro grupos (n=10 animais/grupo) e pré-tratados com metil-escopolamina (1 mg/Kg, s.c.), veículo - salina 0,9% - (1 mL/kg, i.p.) ou MK-801 (0,06 mg/Kg, i.p.), 30 min após receberam o tratamento com Pilo (150 mg/Kg), ou veículo, e foram avaliados 24 h após no LCE. O desenho do protocolo experimental está demonstrado na figura 5.

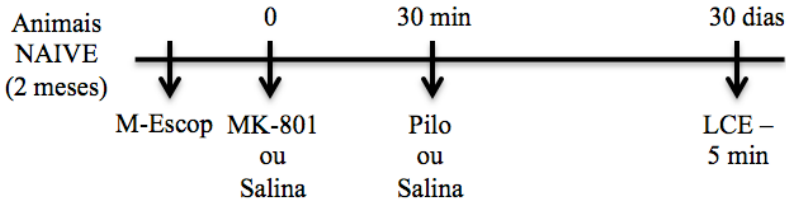
Figura 5. Protocolo experimental utilizado para avaliação dos efeitos do pré-tratamento com antagonista dos receptores NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da pilocarpina 24 h após tratamento com Pilocarpina.



No experimento seguinte, animais com 60 dias foram divididos em quatro grupos (n=10 animais/grupo) e pré-tratados com metil-escopolamina (1 mg/Kg, s.c.), veículo- salina 0,9% - (1 mL/kg, i.p.) ou MK-801 (0,03 ou 0,06 mg/Kg, i.p.). Após 30 minutos os animais

receberam o tratamento com Pilo (150 mg/Kg) ou veículo e avaliados 30 dias após. O desenho do protocolo experimental está demonstrado na figura 6.

Figua 6. Protocolo experimental utilizado para avaliação dos efeitos do pré-tratamento com antagonista dos receptores NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da pilocarpina 30 dias após o pré-tratamento com o antagonista.



4.5.2 Tratamento com MK-801

4.5.2.1 Avaliação dos efeitos do tratamento com MK-801 24 h ou 30 dias após o pré-tratamento com Pilocarpina

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=10 animais/grupo). Ratos com 90 dias receberam o pré-tratamento com metil-escopolamina (1 mg/Kg, s.c.), 30 minutos depois foram injetados com veículo - salina 0,9% - (1 mL/kg, i.p) ou Pilo (150 mg/Kg, i.p.) e após 24 h foram tratados com MK-801 (0,06 mg/Kg, i.p.) ou veículo, 30 min antes da exposição ao LCE. O esquema do protocolo experimental é demonstrado na figura 7.

4.6 IMUNODETECCÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*

Os animais submetidos ao tratamento com MK-801 (item 4.5.2) foram anestesiados (5 animais/grupo), imediatamente após o término do teste comportamental no LCE, e decapitados para a coleta de tecido cerebral. Os encéfalos removidos foram lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) resfriada à 4°C e, imediatamente após, dissecados sobre uma placa de Petri sobreposta em gelo seco. Os hipocampus e a porção pré-frontal do córtex foram depositados em Eppendorfs® siliconizados e armazenados em *freezer* a -80°C até o período da utilização para cada ensaio planejado.

As amostras de hipocampo e córtex pré-frontal foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos) em tampão RIPA gelado composto por Nonidet P- 40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, tampão PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 µg/mL, pepstatina A 20 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL e fenilmetilsulonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e em seguida centrifugadas (10.000 g, 4°C) durante 10 min. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Os extratos celulares totais foram armazenados em *freezer* a -80°C até o momento da quantificação das proteínas.

Os experimentos de *Western blotting* foram realizados conforme descrito por Dutra (2012). Os extratos dos tecidos

previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (4,44 mg/mL), misturados em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris HCl 150 mM (pH 6,8), β -mercaptoetanol 15 %, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3 %, glicerol 25 %) e fervidos por 10 minutos a 100°C.

Quantidades iguais de proteínas para cada amostra (9 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (10%). A etapa seguinte consistiu na transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1h. Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e Tween 0,05 % em água destilada) contendo leite desnatado (5 %) por, no mínimo, 1 h, à temperatura ambiente.

Após a lavagem em TBS-T (4 vezes), as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para cada anticorpo primário contra as seguintes proteínas de interesse para o estudo: anti- β -actina (1:1000, sc-8u78, Santa Cruz *Biotech Inc*, CA, EUA), anti-proteína *nNos* (1:1000, sc-1025, Santa Cruz *Biotech Inc*, CA, EUA), anti-proteína PSD-95 (1:1000, #2507, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas em TBS- T (5 vezes) e incubadas com anticorpo secundário específico (coelho ou camundongo) conjugado à peroxidase (1:25.000, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA) durante 2h à temperatura ambiente.

Os imuno-complexos foram visualizados usando o sistema de detecção de substrato quimioluminescente *SuperSignal West Femto* (Thermo *Fischer Scientific*, Rockford, IL, EUA) e as membranas foram

foto documentadas no Sistema de Fotodocumentação *Chemidoc MP* BIORAD®. Os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa *Image Lab*® e os valores foram expressos como unidades arbitrárias em relação a β -actina.

4.7 Análise estatística

Dados do teste comportamental (labirinto em cruz elevado) e *Western blot* apresentaram normalidade e homogeneidade de variância. Estes dados foram expressos como média \pm E.P.M. e avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (*two-way*), seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls para múltiplas comparações, tendo como variáveis independentes os fatores “pré-tratamento” e/ou “tratamento”. Foram utilizados para as análises estatísticas e produção dos gráficos os programas *Statistica*® versão 8.0 (StaSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e *GraphPad Prism*® versão 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

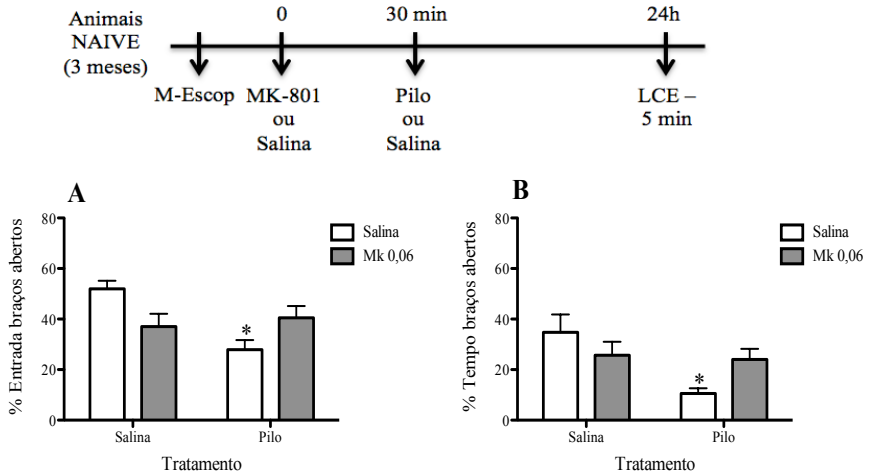
5. RESULTADOS

5.1. PRÉ TRATAMENTO COM MK-801

5.1.1. Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com MK-801 24 h ou 30 dias após o tratamento com pilocarpina

O objetivo deste experimento foi verificar se o pré-tratamento com MK-801 era capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos desencadeados pela Pilo 24h após o tratamento com o agonista muscarínico. Os animais foram tratados conforme protocolo descrito no item 4.5.1.1. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do tratamento, bem como uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento, para os parâmetros de %EBA [T: $F(1, 25) = 5,72, p \leq 0,05$; PTxT: $F(1, 25) = 10,18, p \leq 0,05$] e %TBA [T: $F(1, 25) = 6,78, p \leq 0,05$; PTxT: $F(1, 25) = 5,13, p \leq 0,05$]. Conforme esperado, o *post hoc* revelou que os animais tratados com Pilocarpina apresentaram menor exploração dos braços abertos quando comparado com o grupo controle, demonstrando assim um perfil ansiogênico. O tratamento com MK-801 mostrou uma tendência a prevenir os efeitos ansiogênicos nos animais que receberam Pilocarpina (figura 9). O número de entrada nos braços fechados não foi alterado pelos tratamentos [PT: $F(1,25) = 2,28, p = 0,14$; T: $F(1,25) = 0,004, p = 0,98$; PTxT: $F(1,25) = 1,09, p = 0,31$] (figura 10).

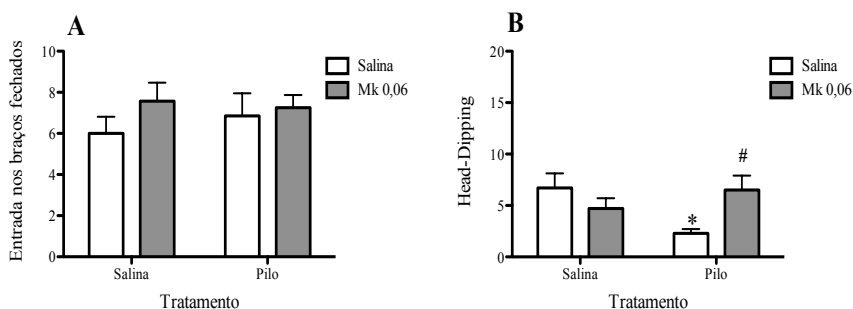
Figura 9. Efeitos do pré-tratamento com MK-801 ou Salina em animais tratados com Salina ou Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) e avaliados no LCE 24 h. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. (B) Porcentagem de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM (n=10 animais/grupo). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



Com relação aos parâmetros etológicos analisados, não foram observadas diferenças significativas no comportamento de *rearing* (tabela 1). A ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento no comportamento de estiramento corporal [PTxT: $F(1,25)=6,46$, $p \leq 0,05$] e *head-dipping* [PTxT: $F(1,25)=7,20$, $p \leq 0,05$]. O *post hoc* revelou que os animais que receberam salina e Pilocarpina apresentaram uma diminuição significativa no comportamento de estiramento corporal (tabela 1) e *head-dipping* quando comparados ao grupo controle (figura 10). E, por outro lado, o pré-tratamento com MK-801 preveniu a diminuição do comportamento de *head-*

dipping vista nos animais tratados com Pilo, uma vez que estes animais demonstraram um aumento de *head-dipping* (figura 10).

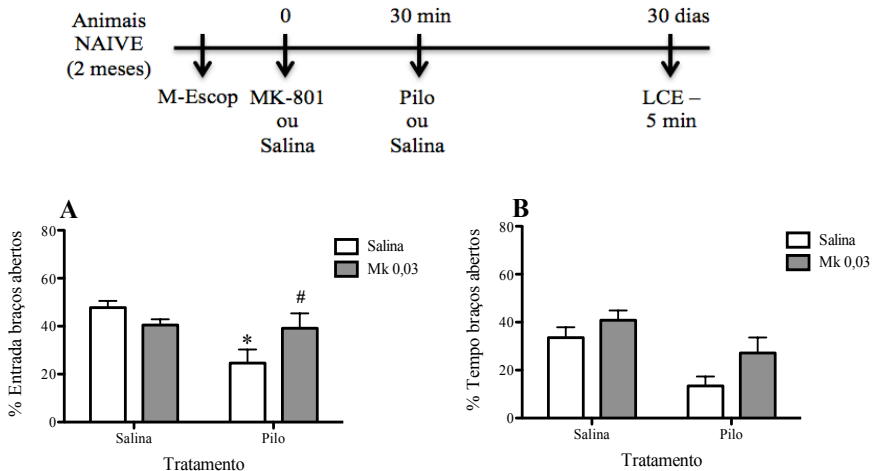
Figura 10. Efeitos do pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA MK-801 nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 24 h. (A) Frequência de entradas nos braços fechados. (B) Frequência de *head-dipping* no labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM (n=10 animais/grupo). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



No intuito de verificar se o antagonismo prévio dos receptores NMDA com MK-801 era capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos desencadeados pela administração de Pilocarpina 30 dias após o tratamento com o agonista muscarínico os animais foram pré-tratados com a dose de 0,03 mg/Kg de MK-801 e o comportamento foi avaliado no LCE, 30 dias após a Pilocarpina, de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.1.1. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do tratamento, bem como uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento, para o parâmetro de %EBA [T: $F(1, 32) = 7,70, p \leq 0,05$; PTxT: $F(1, 32) = 6,06, p \leq 0,05$]. Conforme esperado, o *post hoc* revelou que os animais tratados com Pilocarpina apresentaram uma redução na porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparado com

o grupo controle. O pré-tratamento com MK-801 preveniu os efeitos ansiogênicos nos animais que receberam Pilocarpina (figura 11). Com relação ao parâmetro de %TBA, a ANOVA de duas vias revelou um efeito geral significativo do pré-tratamento e do tratamento [PT: $F(1, 32)=5.03$, $p\leq 0,05$; T: $F(1,32)= 12.99$, $p\leq 0,05$] (figura 11). O número de entrada nos braços fechados não foi alterado pelos tratamentos [PT: $F(1,32)=0,19$, $p=0,67$; T: $F(1,32)=1,02$, $p=0,32$; PTxT: $F(1,32)=1,57$, $p=0,22$] (figura 12).

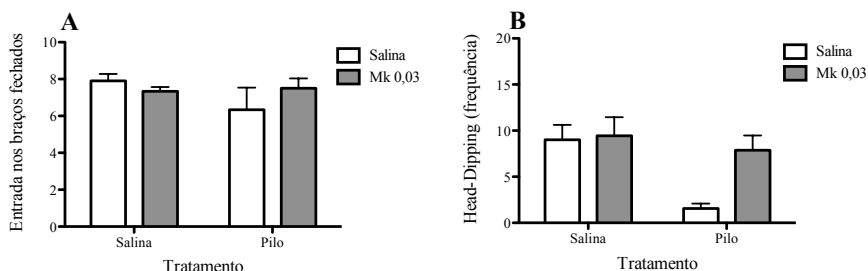
Figura 11. Efeitos do pré-tratamento com MK-801 (0,03 mg/kg) ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. (B) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM ($n=10$ animais/grupo). * $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) e, quando aplicável, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



Quanto aos parâmetros etológicos analisados, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos de estiramento corporal e *rearing*

(tabela 1). No comportamento de *head-dipping*, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do pré-tratamento e do tratamento [PT: $F(1,32)=4,73, p\leq 0,05$; T: $F(1,32)=8,41, p\leq 0,05$] (figura 12).

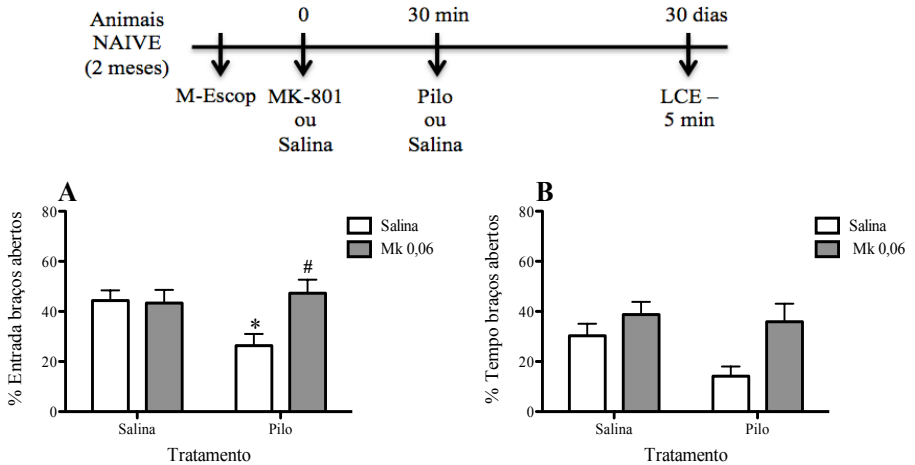
Figura 12. Efeitos do pré-tratamento com antagonista MK-801 (0,03 mg/kg) do receptor NMDA ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após. (A) Número de entradas nos braços fechados. (B) Frequência de *head-dipping* no labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM (n=10 animais/grupo). * $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) e, quando aplicável, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



Com o intuito de analisar se o antagonismo prévio dos receptores NMDA era capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos da Pilocarpina 30 dias após o tratamento com o agonista colinérgico, os animais foram pré-tratados com MK-801 na dose de 0,06 mg/kg, de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.1.1. A ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento, para o parâmetro de %EBA [PTxT: $F(1, 34)=4,65, p\leq 0,05$]. Conforme esperado, o *post hoc* revelou que os animais tratados com Pilocarpina apresentaram uma redução na porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparado com o grupo controle. O pré-tratamento com MK-801 preveniu os efeitos ansiogênicos nos animais que receberam Pilocarpina

(figura 13). Com relação ao parâmetro de %TBA, a ANOVA de duas vias revelou um efeito geral significativo do pré-tratamento e do tratamento [PT: $F(1, 34)=9,43$, $p\leq 0,05$; T: $F(1,34)=6,28$, $p\leq 0,05$] (figura 13). O número de entrada nos braços fechados não foi alterado pelos tratamentos [PT: $F(1,34)=0,46$, $p=0,50$; T: $F(1,34)=0,12$, $p=0,73$; PTxT: $F(1,34)=2,92$, $p=0,10$] (figura 14).

Figura 13. Efeitos do pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. (B) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM ($n=10$ animais/grupo). * $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) e, quando aplicável, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



Dentre os parâmetros etológicos analisados, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos de estiramento corporal e *rearing*, porém os animais pré-tratados com salina e tratados com Pilocarpina apresentaram um aumento no parâmetro de estiramento corporal em relação aos

outros grupos (tabela 1). A ANOVA de duas vias mostrou um interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento no comportamento de *head-dipping* [PTxT:F(1,34)=4,62, $p \leq 0,05$]. O *post hoc* revelou que os animais que receberam salina e Pilocarpina apresentaram um diminuição significativa no comportamento de *head-dipping* quando comparados ao grupo controle. E, por outro lado, o pré-tratamento com MK-801 preveniu a diminuição do comportamento de *head-dipping* nos animais tratados com Pilo, uma vez que estes animais fizeram mais *head-dipping* (figura 14).

Figura 14. Efeitos do pré-tratamento com antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento. (A) Número de entradas nos braços fechados. (B) Número de *head-dipping* nos animais submetidos ao labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM (n=10 animais/grupo). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

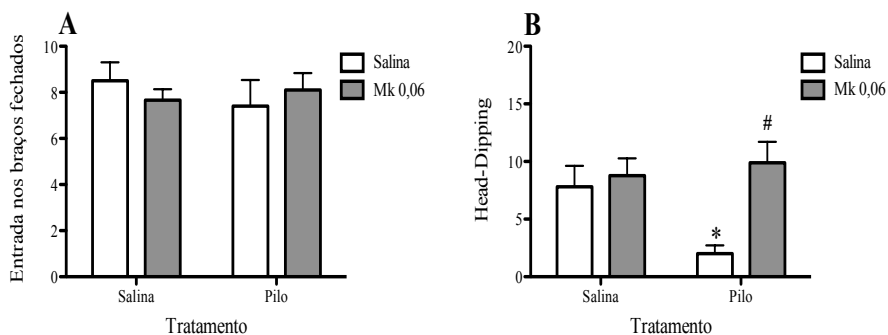


Tabela 1. Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado, em animais pré-tratados com MK-801, 24 h ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.). Os dados representam a média \pm EPM.

Tratamentos (mg/Kg, i.p)	Tempo	Estiramento Corporal	Rearing
Sal + Sal	24 h	2,86 \pm 0,77	11,29 \pm 1,5
MK 0,06 + Sal	24 h	6,14 \pm 1,35	10,29 \pm 1,10
Sal + Pilo	24 h	7,43 \pm 0,92*	13 \pm 1,7
MK 0,06 + Pilo	24 h	5,38 \pm 1,05	11,87 \pm 0,72
Sal + Sal	30 dias	3,80 \pm 0,99	12,20 \pm 0,88
MK 0,03 + Sal	30 dias	6,00 \pm 1,09	10,00 \pm 1,41
Sal + Pilo	30 dias	6,00 \pm 1,05	11,00 \pm 0,74
MK 0,03 + Pilo	30 dias	7,00 \pm 1,00	13,25 \pm 1,13
Sal + Sal	30 dias	4,30 \pm 1,06	13,10 \pm 0,84
MK 0,06 + Sal	30 dias	3,77 \pm 0,68	11,22 \pm 1,02
Sal + Pilo	30 dias	6,00 \pm 0,98	12,40 \pm 1,25
MK 0,06 + Pilo	30 dias	4,10 \pm 1,06	13,60 \pm 1,27

Legenda: * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Sal + Sal”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) e, quando aplicável, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls

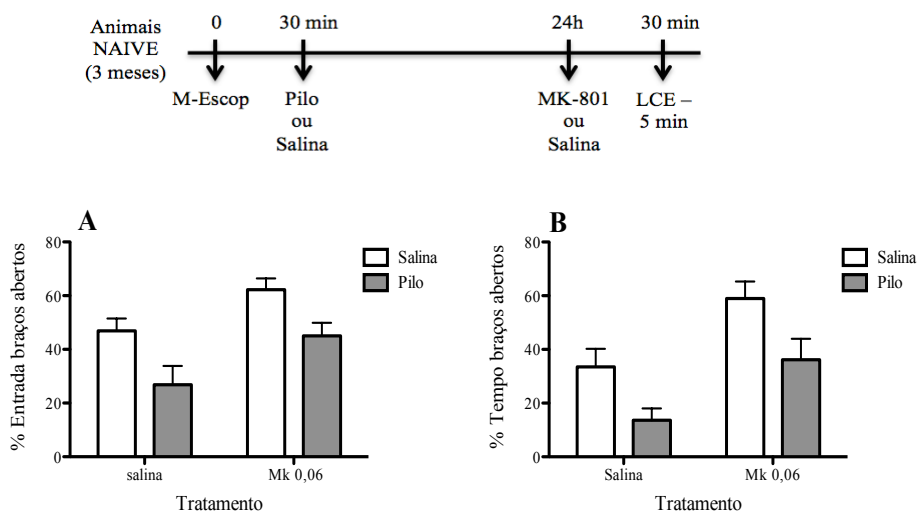
5.2. TRATAMENTO COM MK-801

5.2.1. Avaliação dos efeitos da administração de MK-801 24 h e 30 dias após o pré-tratamento com Pilocarpina

O objetivo deste experimento foi verificar se o tratamento com MK-801 24 h após o pré-tratamento com Pilo era capaz de reverter os efeitos ansiogênicos desencadeados pela administração do agonista muscarínico. O protocolo de

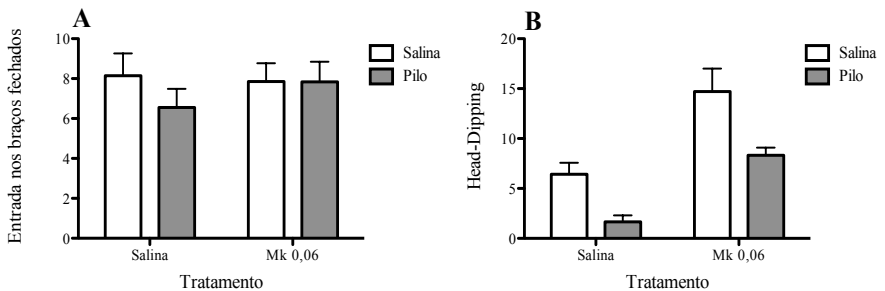
tratamento utilizado está descrito no item 4.5.2.1. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do pré-tratamento e do tratamento, para os parâmetros de %EBA [PT: $F(1,25)=10,24$, $p\leq 0,05$; T: $F(1,25)=8,14$, $p\leq 0,05$] e %TBA [PT: $F(1, 25)=12,19$; $p\leq 0,05$; T: $F(1, 25)=15,37$; $p\leq 0,05$] (figura 15). O número de entradas nos braços fechados não foi alterado pelos tratamentos [PT: $F(1,25)=0,64$, $p=0,43$; T: $F(1,25)=0,24$, $p=0,63$; PTxT: $F(1,25)=0,60$, $p=0,44$] (figura 16).

Figura 15. Efeitos do tratamento com MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 24 h após o tratamento com o agonista muscarínico. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. (B) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM ($n=10$ animais/grupo). * $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Pilo + Salina”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*).



Com relação aos parâmetros etológicos analisados, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos de *rearing* e estiramento corporal (tabela 2). No comportamento de *head-dipping*, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do pré-tratamento e do tratamento [PT: $F(1,25)=17,08$, $p\leq 0,05$; T: $F(1,25)=30,76$, $p\leq 0,05$] (figura 16).

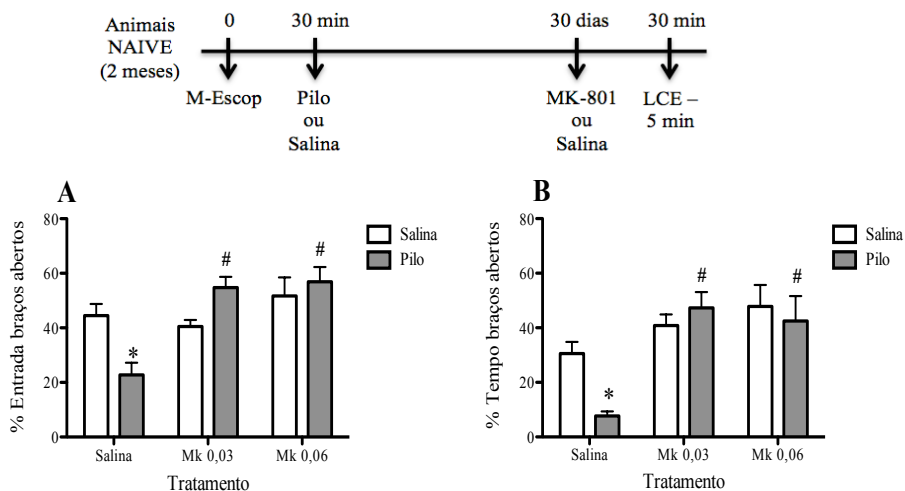
Figura 16. Efeitos da administração do antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 24 h após o tratamento com o agonista muscarínico. (A) Número de entradas nos braços fechados. (B) Número de *head-dipping* no labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM ($n=10$ animais/grupo). * $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P\leq 0,05$ em relação ao grupo “Pilo + Salina”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*).



Com o intuito de verificar se o antagonismo dos receptores NMDA era capaz de reverter os efeitos ansiogênicos da Pilocarpina 30 dias após o tratamento com antagonista os animais foram tratados com MK-801 (0,03 e 0,06 mg/Kg), de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.2.1. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do tratamento, bem como uma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento, para os parâmetros de %EBA [T: $F(2,47)= 8,99$, $p\leq 0,05$; PTxT: $F(2,47)= 7,09$, $p\leq 0,05$] e %TBA [T: $F(2,47)= 12,81$, $p\leq 0,05$; PTxT: $F(2,47)= 3,43$, $p\leq 0,05$]. Conforme esperado, o

post hoc revelou que os animais tratados com Pilocarpina apresentaram menor exploração dos braços abertos quando comparado com o grupo controle, demonstrando assim um perfil ansiogênico. De maneira oposta, o tratamento com MK-801 reverteu os efeitos ansiogênicos nos animais que receberam Pilocarpina, uma vez que os animais tratados com o antagonista glutamatérgico apresentaram um aumento na exploração dos braços abertos em comparação aos animais “Pilo + Salina” (figura 17). O número de entradas nos braços fechados não foi alterado pelos tratamentos [PT: $F(2,47)=1,40$, $p=0,24$; T: $F(2,47)=0,74$, $p=0,93$; PTxT: $F(2,47)=0,74$, $p=0,93$ (figura 18).

Figura 17. Efeitos da administração do antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento com o agonista muscarínico. (A) Porcentagem de entradas nos braços abertos. (B) Porcentagem de tempo despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. As barras representam a média \pm EPM ($n=10$ animais/grupo). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Pilo + Salina”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



Com relação aos parâmetros etológicos analisados, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos de *rearing* e estiramento corporal (tabela 2). Com relação ao comportamento de *head-dipping*, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito geral significativo do pré-tratamento e do tratamento [PTxT: $F(1,47)=4,08$; $p \leq 0,05$; T:F(2, 47)=15,14; $p \leq 0,05$] (figura 18).

Figura 18. Efeitos da administração do antagonista do receptor NMDA MK-801 ou Salina 30 min antes da exposição ao LCE nas respostas ansiogênicas da Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) 30 dias após o tratamento com o agonista muscarínico. (A) Número de entradas nos braços fechados. (B) Número de *head-dipping* nos animais pré-tratados Pilo que receberam MK-801 (0,03 e 0,06 mg/Kg, i.p). As barras representam a média \pm EPM (n=10 animais/grupo). * $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Salina + Salina”. # $P \leq 0,05$ em relação ao grupo “Pilo + Salina”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*).

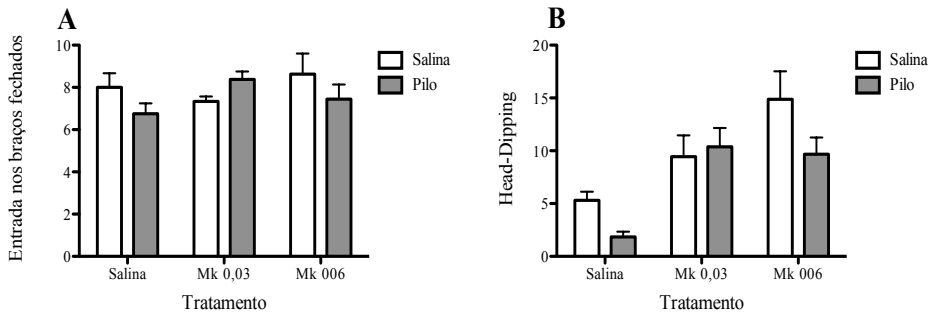


Tabela 2. Parâmetros etológicos avaliados no labirinto em cruz elevado, em animais tratados com MK-801 24 h e 30 dias após o tratamento. Os dados representam a média \pm EPM.

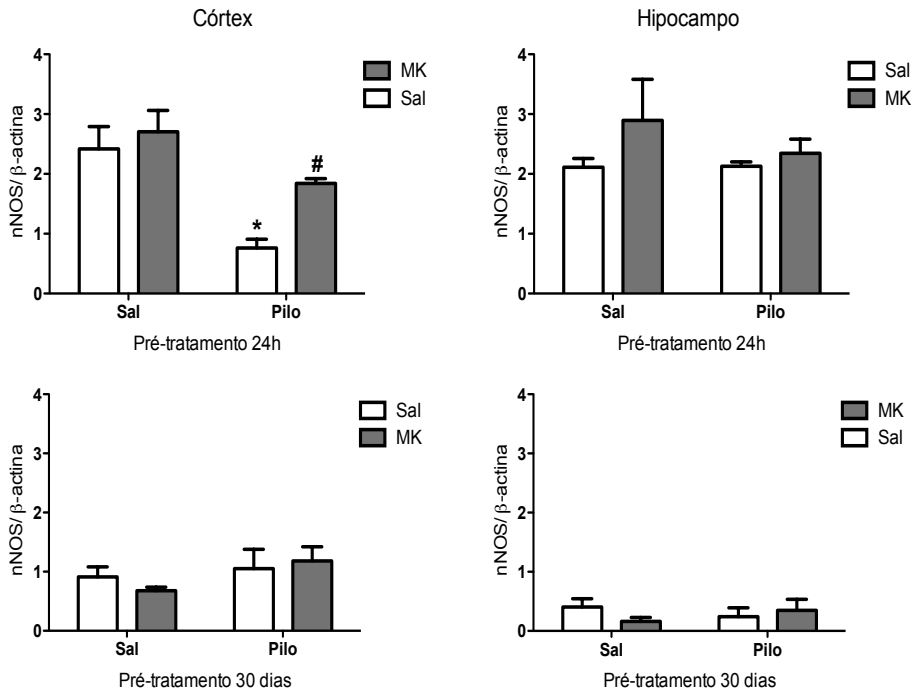
Tratamentos (mg/Kg, i.p)	Tempo	Estiramento Corporal	Rearing
Sal + Sal	24 h	2,14 \pm 0,55	10,57 \pm 1,13
Sal + MK 0,06	24 h	1,57 \pm 0,72	8,00 \pm 1,30
Pilo + Sal	24 h	3,55 \pm 0,53	10,77 \pm 0,95
Pilo + MK 0,06	24 h	3,66 \pm 0,80	10,33 \pm 1,54
Sal + Sal	30 dias	3,90 \pm 0,79	12,70 \pm 2,14
Sal + MK 0,03	30 dias	6,00 \pm 1,09	10,00 \pm 1,41
Sal + MK 0,06	30 dias	2,75 \pm 0,96	10,25 \pm 1,54
Pilo + Sal	30 dias	7,08 \pm 1,14	13,73 \pm 1,18
Pilo + MK 0,03	30 dias	3,62 \pm 0,38	9,50 \pm 0,76
Pilo + MK 0,06	30 dias	4,00 \pm 0,83	10,57 \pm 1,42

5.3. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*

Objetivando melhor investigar a participação dos receptores NMDA e os possíveis mecanismos envolvidos no perfil ansiogênico gerado pela Pilocarpina, os níveis de expressão das proteínas nNOS e PSD-95 foram avaliados nos animais tratados com MK-801 24 h e 30 dias após o pré-tratamento com Pilocarpina (protocolo descrito no item 4.5.2.1). O tratamento com Pilocarpina diminuiu significativamente a expressão de nNOS no córtex dos animais avaliados 24 h após a administração da droga [PT: $F(1,8) = 21,58$; $p \leq 0,05$; T: $F(1,8) = 6,32$; $p \leq 0,05$], enquanto que o tratamento com MK-801

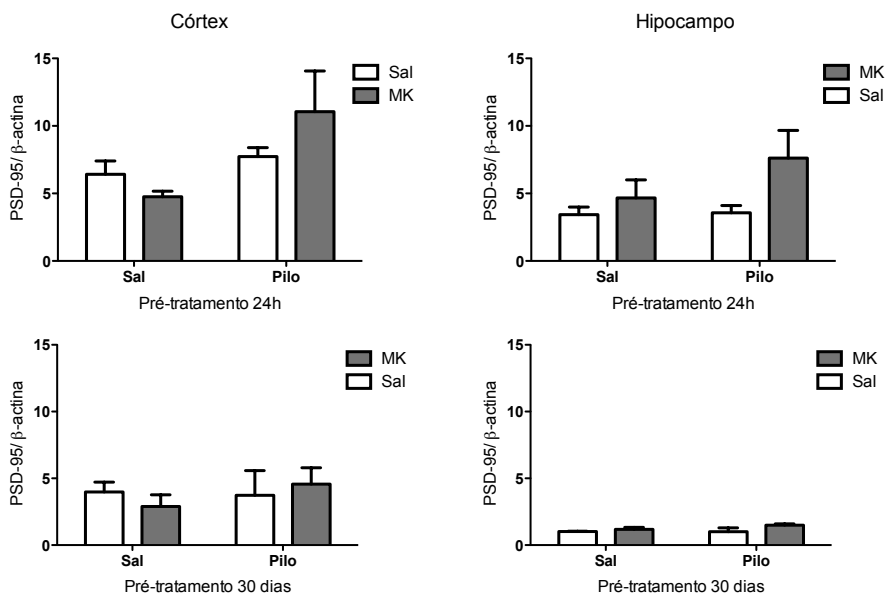
reverteu de maneira significativa este efeito. Estes resultados não foram observados 30 dias após o tratamento (figura 19).

Figura 19. Efeitos da administração de Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) e MK-801 (0,06 mg/Kg, i.p.) na expressão de nNOS no córtex e hipocampo de ratos 24h e 30 dias após o pré-tratamento com o agonista muscarínico. O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do *Western blot* para a proteína nNOS, corrigidos pelo valor do controle genômico β -actina. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo “Sal + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*two-way*) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



Por outro lado o tratamento com Pilocarpina não alterou significativamente os níveis de expressão da proteína PSD-95 (figura 20). Porém, de modo semelhante, ambas as proteínas apresentaram uma tendência a diminuição da expressão 30 dias após o tratamento, sugerindo um provável mecanismo de adaptação, isto é, direta ou indiretamente pode estar ocorrendo uma compensação nos níveis de NO por adaptação.

Figura 20. Efeitos da administração de Pilocarpina (150 mg/Kg, i.p.) e MK-801 (0,06 mg/Kg, i.p.) na expressão de PSD-95 no córtex e hipocampo de ratos 24h e 30 dias após o pré-tratamento com o agonista muscarínico. O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do *Western blot* para a proteína PSD-95, corrigidos pelo valor do controle genômico β -actina. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo “Sal + Pilo”. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA (*Two-Way*) seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.



6. DISCUSSÃO

O LCE tem sido amplamente utilizado como um modelo que fornece medidas independentes do comportamento de ansiedade - entradas ou tempo gasto nos braços abertos - e atividade locomotora - entradas nos braços fechados - em roedores (File, 2001; Carobrez & Bertoglio, 2005). Animais que apresentam um comportamento do tipo ansiogênico evitam naturalmente os braços abertos do LCE, e compostos ansiolíticos tendem a aumentar a exploração dos braços abertos, sem afetar o número de entradas nos braços fechados, um parâmetro vinculado a mobilidade que permite detectar alterações locomotoras (Rodgers & Cole, 1994; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Apesar do avanços farmacológicos nos tratamentos para os transtornos de ansiedade, e da maior compreensão a respeito da fisiopatologia da ansiedade e mecanismos neurobiológicos dessas doenças, novas abordagens ainda são necessárias, devido ao fato que há resistência de alguns transtornos às terapias atualmente empregas, bem como seus efeitos colaterais (Farach, 2012).

No presente estudo observou-se que os animais tratados com a dose não-convulsivante de Pilocarpina (150 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa na exploração dos braços abertos do LCE, vista através da redução no número de entradas, bem como o tempo despendido nestes braços. Além disso, a administração do agonista muscarínico acarretou na diminuição significativa de um comportamento etológico relacionado à avaliação de risco, as imersões desprotegidas de cabeça (*unprotected head-dipping*), em comparação ao grupo controle. Esse resultado sugere um perfil ansiogênico nos animais que foram avaliados 24h ou 30 dias após o tratamento com a Pilocarpina. Não foram encontradas quaisquer alterações locomotoras nestes animais, uma vez que o número de entradas nos braços fechados não apresentou diferença dos valores

observados nos animais controles.

Estudos pré-clínicos têm evidenciado o papel do sistema colinérgico sobre a regulação de estruturas límbicas, e as diferentes respostas comportamentais envolvidas nos estados de ansiedade (Graef, 2011). Os achados no presente estudo, mencionados acima, vão ao encontro de dados obtidos em nosso laboratório que mostram um efeito ansiogênico por até três meses, promovido pela administração sistêmica de Pilocarpina em ratos (Duarte, Gavioli *et al.*, 2010). Também foram observadas respostas ansiogênicas induzidas pela pilocarpina em diferentes testes de ansiedade/medo como o labirinto em T e o campo aberto, um mês após a sua administração (Duarte, Duzzioni *et al.*, 2013).

A(s) razão (ões) pela qual (is) isto ocorre ainda não são bem entendidas, mas, é relatado na literatura a ativação dos receptores muscarínicos é capaz de potencializar a neurotransmissão excitatória mediada por receptores do tipo NMDA (Markram & Segal, 1990; Aramakis *et al.*, 1997; Volpicelli & Levey, 2004).

Tem sido demonstrado que os sistemas glutamatérgico e colinérgico estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória. Na realidade, existe na literatura um amplo leque de evidências que sugere a interação entre esses dois sistemas na mediação das funções cognitivas (Ohno & Watanabe, 1996; Hlinak & Krejci, 1998; Moreira *et al.*, 2005; Mahmoodi *et al.*, 2010; Doguc *et al.*, 2012). Porém, estudos que evidenciam a interação entre os sistemas glutamatérgico e colinérgico-muscarínico nos transtornos de ansiedade ainda são escassos.

Vários modelos animais têm mostrado uma correlação entre a neurotransmissão glutamatérgica e a ansiedade. Um estudo utilizando o modelo de privação de sono em ratos mostrou que, animais privados de sono

dispenderam mais tempo nos braços abertos quando avaliados no LCE, além de apresentarem um aumento significativo nos níveis de glutamato no córtex medial pré-frontal, em comparação aos animais com ciclo normal de sono (Cortese & Phan, 2005; Cortese *et al.*, 2010).

Diversas linhas de evidência sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica em regiões límbicas, como o hipocampo, o córtex e a amígdala, desempenha um papel crucial na patogênese dos transtornos de ansiedade (Walker & Davis, 2000; Bauer *et al.*, 2002; Millan, 2003; Bergink *et al.*, 2004). Paradigmas comportamentais relacionados com a ansiedade têm sido utilizados para testar as drogas com potencial de ação ansiolítica, e, o sistema glutamatérgico tem recebido muita atenção como um alvo para o tratamento de transtornos de ansiedade, devido a estudos pré-clínicos em animais, bem como, testes de medicamentos em humanos, que apresentaram uma boa evidência da eficácia de drogas glutamatérgicas para o tratamento da ansiedade (Carobrez, 2003; Cortese & Phan, 2005).

Diferentes antagonistas dos receptores NMDA têm sido avaliados através de testes não-condicionados de ansiedade, como, por exemplo, o antagonista competitivo AP7 que mostrou propriedades ansiolíticas no LCE e no teste de Vogel (Guimarães *et al.*, 1991; Molchanov & Guimarães, 2002). Além desses, os antagonistas não-competitivos também tem sido amplamente estudados. O MK-801, por exemplo, apresentou efeitos ansiolíticos no LCE (Bertoglio & Carobrez, 2003; Mohammad *et al.*, 2011). Esses dados têm mostrado que compostos capazes de reduzir a neurotransmissão do glutamato, pelo bloqueio dos seus receptores ou através da redução da sua liberação dos terminais, produzem um efeito com perfil ansiolítico em modelos de ansiedade (Carobrez, 2003; Cortese & Phan, 2005). Nesse contexto, o antagonismo dos receptores do tipo NMDA apresenta-se como uma ferramenta validada para a

investigação de respostas ansiolíticas em diversos testes não condicionados de ansiedade (Barkus *et al.*, 2010).

Os resultados do presente estudo mostraram que o pré-tratamento de animais com o antagonista dos receptores NMDA MK-801, nas duas doses utilizadas, foi capaz de prevenir os efeitos ansiogênicos desencadeados pela administração sistêmica de Pilocarpina em dose subconvulsivante. Isso devido aos níveis de exploração dos braços abertos apresentado pelos animais Pilo, pré-tratados com o antagonista glutamatérgico, serem significativamente maiores em relação aos animais Pilo pré-tratados com salina, quando avaliados 24 h e 30 dias após o tratamento.

Visto que o pré-tratamento com o MK-801 foi capaz de prevenir os efeitos provocados pela Pilo, verificou-se também se o tratamento com o antagonista glutamatérgico era capaz de reverter os efeitos ansiogênicos quando já estabelecidos, após a administração do agonista colinérgico.

O tratamento com MK-801 reverteu os efeitos ansiogênicos da Pilocarpina, visto que os animais Pilo tratados com MK-801 demonstraram um aumento significativamente maior na exploração dos braços abertos quando comparados aos animais Pilo tratados com salina. Em ambas etapas, prevenção e tratamento, os animais tratados com Pilocarpina que receberam MK-801 apresentaram um aumento significativo na frequência de imersões de cabeça (*head-dipping*). Esse perfil é esperado e consistente com outros trabalhos descritos na literatura (Kocahan *et al.*, 2012; Kocahan & Kubra, 2013). Por se tratar de um comportamento exploratório, e, uma vez que a exploração dos braços abertos foi aumentada pela administração do antagonista glutamatérgico, espera-se, conseqüentemente, que a frequência no comportamento de *head-dipping* também aumente, como ocorreu no presente trabalho.

Os achados mencionados acima corroboram com diversos trabalhos que

relatam o MK-801 como um ansiolítico altamente eficaz no teste do LCE e em testes de interação social em ratos (Bertoglio & Carobrez, 2003; Barkus *et al.*, 2010; Mohammad *et al.*, 2011; Kocahan & Kubra, 2013), além de sugerirem que a modulação da função colinérgica pode ser realizada por meio dos receptores NMDA. Em consonância com o presente estudo encontramos os estudos de Kocahan e Kubra (2013), bem como o de Mohammad e colaboradores (2011), os quais evidenciam o efeito ansiolítico pelo bloqueio dos receptores do tipo NMDA induzido por MK-801 no LCE.

Sabe-se que a ativação dos receptores NMDA no SNC pelo glutamato leva produção de NO, através da abertura dos canais iônicos e, influxo de Ca^{2+} . O Ca^{2+} se liga a calmodulina, que por sua vez estimula a enzima nNOS acarretando na formação de NO (Prast & Philippu, 2001). Assim, a observação no presente estudo de que o bloqueio dos receptores NMDA glutamatérgicos induziu efeitos ansiolíticos no LCE levantou a possibilidade de que o NO também pode estar envolvido na fisiopatologia da ansiedade produzida pela pilocarpina.

Inibidores de NOS tem sido relatados como indutores de efeitos ansiolíticos e antidepressivos significativos em roedores. A administração sistêmica do inibidor de NOS éster de N-metil-L-arginina (L-NAME) ou do inibidor seletivo de NOS 7-nitroindazol (7-NI) produz efeitos do tipo ansiolíticos no LCE e diminui a vocalização ultra-sônica de filhotes de ratos (Faria *et al.*, 1997; Volke *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1999). Além disso, microinjeções intra-dorsolateral na matéria periaquedutal cinzenta ou na amígdala medial de inibidores de NOS produzem efeitos ansiolíticos no LCE e no teste de transição claro-escuro (Guimarães *et al.*, 1994; Forestiero *et al.*, 2006).

Volke e colegas (2003) compararam os efeitos comportamentais de dois inibidores de nNOS em modelos animais preditivos de atividades tipo

antidepressivas e ansiolíticas, a fim de esclarecer o papel das distintas isoformas de nNOS na regulação da depressão e da ansiedade. Camundongos foram administrados sistemicamente com 7-nitroindazol (7-NI) e 1-(2-trifluorometilfenil)imidazol (TRIM)-inibidor mais seletivo de nNOS. A inibição por TRIM causou efeitos do tipo antidepressivos e ansiolíticos, sugerindo que a nNOS pode desempenhar um papel-chave na neurotransmissão dessas patologias.

Por outro lado, há trabalhos na literatura que relatam efeitos duais mediados pela neurotransmissão por NO em vários testes comportamentais, incluindo modelos animais de ansiedade e depressão (Da Silva *et al.*, 2000; Inan *et al.*, 2004; Del Bel *et al.*, 2005). Spiacci e colegas (2008) investigaram se a interferência direta da neurotransmissão mediada por NO no núcleo dorsal da rafe (DR) poderia modificar o comportamento de ratos avaliados no LCE. A injeção direta de L-arginina, um precursor de NO, aumentou significativamente o tempo gasto nos braços abertos do LCE, sugerindo que a facilitação da neurotransmissão de NO provoca um efeito do tipo ansiolítico no DR. Corroborando com essa hipótese a injeção local de L-NAME induziu efeitos do tipo ansiogênicos.

No presente trabalho, o doseamento de proteínas por *Western Blot* mostrou que os animais tratados com Pilo apresentaram uma diminuição significativa da expressão de nNOS na região cortical em relação ao grupo controle, enquanto que o tratamento com MK-801 reverteu significativamente esse efeito 24 h após a administração da droga.

A alteração dos níveis de expressão de nNOS visualizados somente no córtex nos leva a crer que seja um papel específico dessa região, devido a sua importância nas respostas relacionadas aos processos emocionais. Resstel e colaboradores (2007) demonstraram que a ativação de receptores NMDA e a

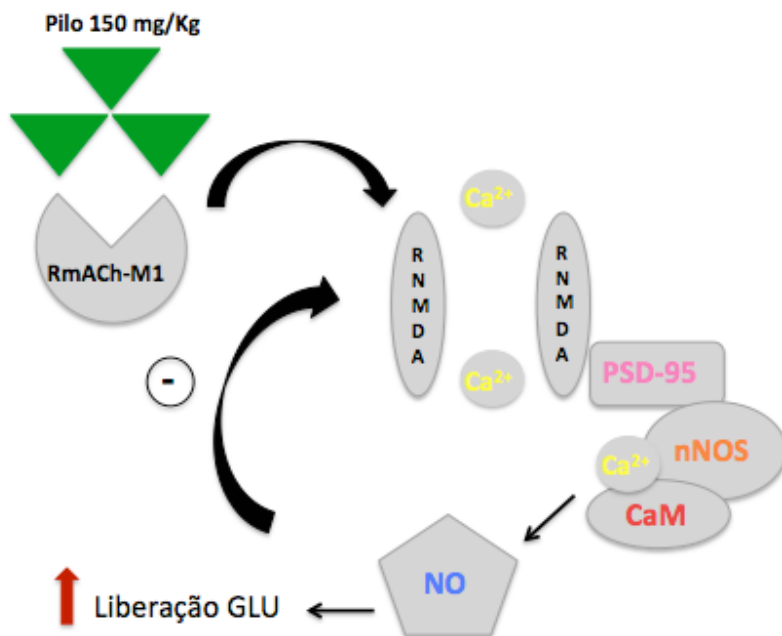
formação de NO no córtex medial pré-frontal (MPFC) desempenha um papel importante na expressão de respostas comportamentais observadas durante o medo evocado por condicionamento contextual. Além disso, lesões excitotóxicas ou a inibição da neurotransmissão (Resstel *et al.*, 2006) atenuam as respostas relacionadas ao medo condicionado aversivo, no LCE, bem como no teste de esconder esferas (Shah & Treit, 2003), sugerindo um importante papel desta região cortical na ampla variedade de respostas do medo e da ansiedade. Wall e colaboradores (2001), por outro lado, mostraram que o bloqueio ou ativação dos receptores muscarínicos (especialmente do subtipo M1) no MPFC promove respostas ansiolíticas ou ansiogênicas, respectivamente, sugerindo que a neurotransmissão colinérgica nesta região induz respostas relevantes na regulação da ansiedade.

A expressão de nNOS pode ser regulada por estímulos físicos, assim como por mudanças na atividade neuronal (Forstermann *et al.*, 1998). Em células granulares do cerebelo, a inibição da transmissão glutamatérgica aumentou drasticamente a expressão de nNOS (Baader & Schilling, 1996), e este efeito também foi observado no presente estudo. Sabe-se que os níveis de nNOS são fosforilados constitutivamente nas células nervosas. Rameau e colegas (2003) observaram uma diminuição progressiva nos níveis de fosforilação de nNOS em neurônios corticais de ratos, regulada através da ativação dos receptores NMDA, e este mecanismo é especificamente bloqueado por antagonistas destes receptores. Esses resultados ajudam a compreender o aumento observado da expressão de nNOS nos animais tratados com MK-801, uma vez que o tratamento com antagonistas de receptores NMDA é capaz de bloquear a desfosforilação de nNOS regulada por estes receptores, e consequentemente, acarretaria no aumento da expressão da enzima nNOS.

Por outro lado, a diminuição da expressão de nNOS nos animais Pilocarpina pode ser um mecanismo regulatório de *feedback* negativo, uma vez que o tratamento com Pilocarpina ativa os receptores NMDA, o que resulta em uma ativação “excessiva” da cascata que leva à formação de NO, que acontece somente no período agudo, justificando assim a diminuição da expressão visualizada apenas 24 h após o tratamento. Desta forma, o aumento nos níveis de expressão observados nos animais tratados com antagonista glutamatérgico ajuda a elucidar a hipótese de um mecanismo de *feedback* negativo, uma vez que ao bloquear o receptor a formação da cascata é desfavorecida, desencadeando na formação de mais proteína a fim de manter os níveis basais. Cronicamente (30 dias) é provável que os mecanismos citados se adaptem ou sejam adaptados, isto é, que direta ou indiretamente aja uma compensação nos níveis de NO por adaptação, que precisa ser melhor investigado para seu entendimento. De maneira semelhante, esse mecanismo de adaptação é visto no comportamento, uma vez que, conforme demonstrado na literatura, o perfil ansiogênico desencadeado pela Pilo (150 mg/Kg) é duradouro, persistindo por até 3 meses após o tratamento com o agonista muscarínico (Duarte *et al.*, 2010).

Os resultados aqui demonstrados sugerem que modulação dos estados ansiosos promovidos pela Pilocarpina parecem depender do influxo de Ca^{2+} , decorrente da ativação dos receptores NMDA, que leva a ativação da enzima nNOS e à produção de NO, e este demonstra regular de maneira negativa a função do receptor NMDA, por levar ao aumento da liberação de glutamato. A liberação de GLU, então, ativa os receptores NMDA, resultando novamente na ativação da cascata de formação de NO, e modulação dos estados ansiosos promovidos pela administração de Pilocarpina. A figura 21 mostra um resumo das hipóteses aqui apresentadas.

Figura 21. Esquema do mecanismo de ação sugerindo a participação do NO na regulação dos efeitos ansiogênicos promovidos pela Pilocarpina. A ativação dos receptores muscarínicos, especialmente do subtipo M1, leva a ativação dos receptores NMDA, que resulta no influxo de cálcio. O cálcio se liga a calmodulina e estimula a enzima nNOS a produzir NO, que por sua vez leva ao aumento da liberação de GLU e regulação negativa dos receptores NMDA.



7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo é possível concluir que:

- i. Um papel importante dos receptores glutamatérgicos-NMDA numa interação sinérgica com os receptores muscarínicos, mostrando que a modulação interativa entre esses dois sistemas neurotransmissores constitui um mecanismo importante no perfil ansiogênico desencadeado pela pilocarpina;
- ii. A ativação dos receptores NMDA pode resultar no influxo de Ca^{2+} decorrente da abertura dos canais iônicos que levaria à ativação de nNOS e, conseqüentemente, à produção de NO, que por sua vez, regularia negativamente a função do receptor NMDA, hipótese esta ainda a ser testada;
- iii. A diminuição da expressão de nNOS nos animais tratados com pilocarpina, efeito revertido pelo tratamento com antagonista glutamatérgico, corrobora a hipótese sugerida como uma possível via de sinalização responsável pela modulação dos estados ansiosos. Entretanto, o conjunto de eventos intracelulares relacionados à essa modulação necessitam ser melhor investigados.

REFERÊNCIAS

- ADELL, A.; CELADA, P.; ABELLAN, M.T.; ARTIGAS, F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. **Brain Research Reviews**, v.39, p.154-180, 2002.
- ALLISON, C.; PRATT, J.A. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. **Pharmacology & Therapeutics**, v.98, p.171-195, 2003.
- ANDREATINI, R.; LACERDA, R.B.; FILHO, D.Z. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: future perspectives. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.23, n.4, p.233-242, 2001.
- ANTONY, M.M.; PICKREN, W.; KOERNER, N. Historical perspectives on psychiatric classification and anxiety disorders. In: Current Perspectives on the Anxiety Disorder: Implications for DSM-V and Beyond. MCKAY, D.; ABRAMOWITZ, J.S.; TAYLOR, S.; ASMUNDSON, G.J.G. New York: Springer Publishing Company; 2009, p.9-40.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders** (First Edition). American Psychiatric Association, Washington, DC, USA, 1952.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders** (Fourth Edition). American Psychiatric Association, Washington, DC, USA, 1994.
- ARAMAKIS, V.B.; BANDROWSKI, A.E.; ASHE, J.H. Activation of muscarinic receptors modulates NMDA receptor-mediated responses in auditory cortex. **Experimental Brain Research**, v.113, n.3, p.484-496, 1997.
- ASZTELY, F.; GUSTAFASSON, B. Ionotropic glutamate receptors: Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. **Molecular Neurobiology**, v.12, p.1-11, 1996.
- BAADER, S. L.; SCHILLING, K. Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. **Journal of Neuroscience**, v.16, p.1440-1449, 1996.

BANACO, R. A.; ZAMIGNANI, D. R. An analytical-behavioral panorama on the anxiety disorders. In: T. C. C. Grassi (org) Contemporary challenges in the behavioral approach: a Brazilian overview. Santo André: ESETEc; 2004. p. 9-26.

BAUER, E.P.; SCHALE, G.E.; LEDOUX, J.E. NMDA receptors and l-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. **Journal of Neuroscience**, v.22, p.5239–5249, 2002.

BARKUS, C.; MCHUGH, S.B.; SPRENGEL, R.; SEEBURG, P.H.; RAWLINS, P.; BANNERMAN, D.M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. **European Journal of Pharmacology**, v.626, n.1, p.49-56, 2010.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v.1, n. 9, 2011.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J.; WESTENBERG, H. G. Glutamate and anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v.14, n.3, p.175-83, May 2004.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 170, p.335-342, 2003.

BOURIN, M.; DEMOULIERE, B.P.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21 (6), p. 567-574, 2007.

BRENMAN, J.E.; BREDT, D.S. Synaptic signaling by nitric oxide. **Current Opinion in Neurobiology**, v.7, p.374–378, 1997.

CAMPBELL, J.O.; FOGARTY, J.A.; SPEAR, L.P. Inhibition of nitric oxide synthesis with L-LAME suppresses isolation-induced ultrasounds in rat pups. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.63, p.45–53, 1999.

CARLSSON, M.; CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v.13, p.272-276, 1990.

CAROBREZ, A.P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, p.52-58, 2003.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.1193-1205, 2005.

CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v.16, n.1-2, p.33-37, 1995.

COBB, S. R.; DAVIES, C. H. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. **The Journal of Physiology**, v.562, n.Pt 1, p.81-8, 2005.

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. **Psychopharmacology**, v.114, n.2, p.288-96, 1994.

CONN, P.J.; PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.37, p.205-237, 1997.

CORTESE, B.M.; PHAN, K.L. The role of glutamate in anxiety and related disorders. **CNS Spectrums**, v.10, p.820-830, 2005.

CORTESE, B.M.; MITCHELL, T.R.; GALLOWAY, M.P.; PREVOST, K.E.; FANG, J.; MOORE, G.J.; UHDE, T.W. Region-specific alteration in brain glutamate: possible relationship to risk-taking behavior. **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 445-50, 2010.

CRASKE, M.G. **Origins of phobias and anxiety disorders: why more women than men?** Department of Psychology, University of California, Los Angeles. **Elsevier**, 2003.

CRATTY, M.S.; BIRKLE, D.L. *N-Methyl-d-aspartate* (NMDA)-mediated corticotropin-releasing factor (CRF) release in cultured rat amygdala neurons. **Peptides**, v.20, p.93–100, 1999.

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p.1129–1161, 2011.

DA SILVA, G.D.; MATTEUSSI, A.S.; DOS SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, v.11, p. 3699–702, 2000.

DE SOUZA, M.; SCHENBERG, L.C.; CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behavioural Brain Research**, v.90, p.157–165, 1998.

DE-MELLO, N.; SOUZA-JUNIOR, I.Q.; CAROBREZ, A.P. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. **Behavioural Brain Research**, v.158, n.2, p.263-268, 2005.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Septal gabaergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. **Neuroscience**, v.117, n.2, p.493-501, 2003.

DEL ARCO, A.; MORA, F. Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the ionotropic activation of glutamate receptors. **Brain Research Bulletin**, v.56, p.125–130, 2001.

DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S.; BERMUDEZ-ECHEVERRY, M.; GOMEZ, M.Z.; SCHIAVETO-DE-SOUZA, A.; PADOVAN-NETO, F.E.; TUMAS, V.; BARION-CAVALCANTI, A.P.; LAZZARINI, M.; NUCCI-DA-SILVA, L.P.; DE PAULA, D.S. Role of nitric oxide on motor behavior. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.25, p.371–92, 2005.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological Reviews**, v.51, p.7-61, 1999.

DUARTE, F.S.; DUZZIONI, M.; HOELLER, A.A.; SILVA, N.M.; ERN, A.L.; PIERMARTIRI, T.C.B.; TASCA, C.I.; GAVIOLI, E.C.; LEMOS, T.; CAROBREZ, A.P.; DE LIMA, T.C.M. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology (Berlin)**, v.227, n.2, p.209-219. 2013.

DUARTE, F.S.; GAVIOLI, E.C.; DUZZIONI, M.; HOELLER, A.A.; CANTERAS, N.S.; LIMA, T.C.M. Short-and long-term anxiogenic effects induced by a single injection of subconvulsivant doses of pilocarpine in rats: investigation of the putative role of hippocampal pathways. **Psychopharmacology**, v.212, p.653-661, 2010.

DUTRA, R.C.; DE SOUZA, P.R.C.; BENTO, A.F.; MARCON, R.; BICCA, M.A.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v.83, n.4, p.531-42, 2012.

DOGUC, D.K.; DELIBAS, N.; VURAL, H.; ALTUNTAS, I.; SUTCU, R.; SONMEZ, Y. Effects of chronic scopolamine administration on spatial working memory and hippocampal receptors related to learning. **Behavioural Pharmacology**, v.23, n.8, p.762-770, 2012.

EGLLEN, R. M. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.43, p.105-136, 2005.

FARACH, F.J.; PRUITT, L.D.; JERUD, A.B.; ZOELLNER, L.A.; ROY-BYRNE, P.P. Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and futere directions. **Journal of anxiety disorders**, v.26, n.8, p. 833-843, 2012.

FARIA, M.S.; MUSCARA, M.N.; MORENO, J.H.; TEIXEIRA ,S.A.; DIAS, H.B.; OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F.G.; NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze

test. **European Journal of Pharmacology**, v.323, p.37-43, 1997.

FELDER, C. C.; BYMASTER, F. P.; WARD, J.; DELAPP, N. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.4333–4353, 2000.

FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavior Brain Research**, v.125, p.151–157, 2001.

FORESTIERO, D.; MANFRIM, C.M.; GUIMARÃES, F.S.; DE OLIVEIRA, R.M. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. **Psychopharmacology**, v.184, p.166–72, 2006.

FORSTERMANN, U.; BOISSEL, J-P.; KLEINERT, H. Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB Journal**, v.10, p.773–90, 1998.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, v.57, p.683–706, 1995.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v.336, p.385–388, 1988.

GRAEF, S.; SCHONKNECHT, P.; SABRI, O.; HEGERL, U. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. **Psychopharmacology (Berl)**, v.215, n.2, p.205-29, 2011.

GRAY, J. A. **The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry in To the Functions of the Septo-hippocampal System**. Oxford: Oxford University Press, 1982.

GRAY, J.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety**. 2nd. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature Reviews**, v.12, p.667-687, 2013.

GROSS,C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, p.545-552, 2004.

GUIMARAES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated-plus maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology (Berl)**, v.103, p.91-94, 1991.

GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; DEL BEL, E.A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **NeuroReport**, v.5, p.1929–32, 1994.

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

HLINAK, Z.; KREJCI, I. Concurrent administration of subeffective doses of scopo- lamine and MK-801 produces a short-term amnesia for the elevated plus-maze in mice. **Behavior Brain Research**, v. 91, p. 83–89, 1998.

HOELLER, A. A.; DUZZIONI, M.; DUARTE, F.S.; COSTA, A.P.R.; DE PIERI, C.H.; DOS SANTOS, A.A.; FARINA, M.; DE LIMA, T.C.M. **Pharmacological validation of the non-convulsive pilocarpine-model of anxiety in rats as evaluated on the elevated plus-maze and open-field tests**. Florence: 8th IBRO World Congress of Neuroscience: p.160, 2011.

HOELLER, A. A. **Investigação de respostas emocionais observadas em ratos tratados com doses subconvulsivantes de pilocarpina: um novo modelo para o estudo de ansiedade traço** [tese de doutorado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia; 2013.

HOLLMANN, M., HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annual Review of Neuroscience**, v. 17, p.31–108, 1994.

INAN, S.Y.; YALCIN, I.; AKSU, F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.77, p.457–64, 2004.

KANFER, F. H.; PHILLIPS, J. S. **Learning foundations of behavior therapy**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1970.

KEMP, J. A.; MCKERNAN, R. M. NMDA receptors as drug targets. **Nature Neuroscience**, v.5, p.1039–1042, 2002.

KIM, M.; MCGAUGH, J.L. Effects of intra-amygdala injections of NMDA receptor antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance. **Brain Research**, v.58, p.35–48, 1992.

KOCAHAN, S.; BABAR, E.; MELIK, E.; AKILLIOGLU, K. The effect of interaction between N-methyl-D-aspartate receptor blockade and growth environment during the last maturation period of the nervous system on anxiety-related behaviour in adulthood in the rat. **Neurochemical Journal**, v.6, n.3, p.194–201, 2012.

KOCAHAN, S.; KUBRA, A. Effects of NMDA Receptor Blockade During the Early Development Period on the Retest Performance of Adult Wistar Rats in the Elevated Plus Maze. **Neurochemical Research**, v.38, p.1496–1500, 2013.

KRYSTAL, J.H.; D'SOUZA, D.C.; PETRAKIS, I.L.; BELGER, A.; BERMAN, R.M.; CHARNEY, D.S.; ABI-SAAB, W.; MADONICK, S. NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders. **Harvard Review Psychiatry**, v.7, n.3, p.125–143, 1999.

LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **Journal of Affective Disorders**, v.61, n.3, p.137–59, 2000.

LEDOUX, J.E. Emotion, memory and the brain. **Scientific American**, v.4, p.32–39, 1994.

LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A.

Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.14, n.4, p.511-7, 1990.

LISTER R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v.92, p.180–185, 1987.

MAHMOODI, G.; AHMADI, S.; POURMOTABBED, A.; ORYAN, S.; ZARRINDAST, M.R. Inhibitory avoidance memory deficit induced by scopolamine: Interaction of cholinergic and glutamatergic systems in the ventral tegmental area. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.94, n.1, p.98-93, 2010.

MAREN, S. Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. **Molecular Neurobiology**, v.13, p.1–22, 1996.

MARKRAM, H.; SEGAL, M. Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine, **The Journal of Physiology**, v.427, p.381, 1990.

MARTIN, P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.98, n.393, p.74-80, 1998.

MCGONIGLE, P. Animal models of CNS disorders. **Biochemical Pharmacology**, v.87, p. 140–149, 2014.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, v.87, p.162–171, 2014.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.28, n.3, p.285-305, May 2004.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.1007-1015, 2000.

MENARD, J.; TREIT, D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal

midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. **Brain Research**, v.888, p.163-166, 2001.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v.70, p.83-244, 2003.

MILLER, S.; KESSLAK, J.P.; ROMANO, C.; COTMAN, C.W. Roles of metabotropic receptors in brain plasticity and pathology. **Annals of New York Academy of Sciences**. v.757, p.460-74, 1996.

MISERANDINO, M.J.D.; SANANES, C.B.; MELIA, K.R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature**, v.345, p.716–718, 1990.

MOGHADDAM, B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. **Biological Psychiatry**, v.51, p.775–787, 2002.

MOHAMMAD, R. Z.; MOHAMMAD, N.; MORTEZA ,P.; NEGAR, H. Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior. **Neuroscience Letters**, v.55, p.65–70, 2011.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v.62, n.1, p.42-53, 2012.

MOLCHANOV, M.L.; GUIMARAES, F.S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.160, p.30-38, 2002

MOREIRA K.M.; FERREIRA, T.L.; FORNARI, R.V.; FIGUEREDO, L.Z.P.; OLIVEIRA, M.G.M. Interaction between M1-muscarinic and glutamatergic NMDA receptors on an inhibitory avoidance task. **Brain Research Bulletin**, v.67, p.504–508, 2005.

MORROW, B.A.; ELSWORTH, J.D.; LEE, E.J.K.; ROTH, R.H. Divergent effects of putative anxiolytics on stress-induced Fos expression in the mesoprefrontal system of the rat. **Synapse**, v.36,

p.143–154, 2000.

NEMEROFF, C.B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacology bulletin*, v.37, n.4, p.133-146, 2003.

OHISHI, H.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, v.53, p.1009–1018, 1993.

OHNO, M.; WATANABE, S. Interactive processing between glutamatergic and cholinergic systems involved in inhibitory avoidance learning of rats. *European Journal of Pharmacology*, v.312, p.145–147, 1996.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.24, n.3, p.525–9, 1986.

PIN, J.P.; DUVOISIN, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, v.34, p.1–26, 1995.

PINHEIRO, C.U.B. Extrativismo, cultivo e privatização do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. *Acta Botânica Brasiliensis*, v.16, n.2, p. 141-150, 2002.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*, v.64, p.51–68, 2001.

PRZEGALINSKI, E.; TATARCZYNSKA, E.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E. The influence of the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil on the anxiolytic-like effects of CGP37849 and ACPC in rats. *Neuropharmacology*, v.39, p.1858–1864, 2000.

RAMEAU, G.A.; CHIU, L-Y.; ZIFF, E.B. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiology*

of Aging, v.24, p.1123–1133, 2003.

RESSTEL, L.B.; JOCA, S.R.; MOREIRA, F.A.; CORREA, F.M.; GUIMARAES, F.S. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.294–298, 2006.

RESSTEL, L.B.M.; CORREA, F. M. A.; GUIMARAES, F.S. The Expression of Contextual Fear Conditioning Involves Activation of an NMDA Receptor--Nitric Oxide Pathway in the Medial Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, p.2027-2033, 2007.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J. e HENDRIE, C. A. (Ed.). **Ethology and Psychopharmacology**, p. 9- 44, 1994.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.21, n.6, p.801-10, 1997.

RODGERS, R.J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.298-304, 1997.

ROSEN, J.B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, v.105, n.2, p.325-350, 1998.

SCHOEPP, D.D. Novel function for subtypes of metabotropic glutamate receptors. **Neurochemistry International**, v.24, p.439-49, 1994.

SCHWENDT, M.; JEZOVA', D. Gene expression of two glutamate receptor subunits in response to repeated stress exposure in rat hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.20, p.319–329, 2000.

SHAH, A.A.; TREIT, D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. **Brain Research**, v.969, p.183–194, 2003.

SHARMA, A.C.; KULKARNI, S.K. Evidence for benzodiazepine receptor interaction with MK 801 in anxiety related behaviour in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.31, p.191–193, 1993.

SMITH, B.N.; DUDEK, F.E. Amino acid-mediated regulation of spontaneous synaptic activity patterns in the rat basolateral amygdala. **Journal of Neurophysiology**, v.76, p.1958–1967, 1996.

SPIACCI, A.J.; KANAMARU, F.; GUIMARAES, F.S.; OLIVEIRA, R.M.W. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.88, p.247–255, 2008.

SYLVERS, P.; LILIENFELD, S.O.; LAPRAIRIE, J.L. Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. **Clinical Psychology Review**, v.31, p.122–137, 2011

TAKAHATA, R.; MOGHADDAM, B. Glutamatergic regulation of basal and stimulus-activated dopamine release in the prefrontal cortex. **Journal of Neurochemistry**. v.71, p.1443–1449, 1998.

VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KOKS, S.; BOURIN, M.; MANNISTO, P.T.; VASAR, E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v.131, p.399–405, 1997.

VOLKE, V.; WEGENER, G.; BOURIN, M.; VASAR, E. Antidepressant- and anxiolytic- like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behavioural and Brain Research**, v.140, p.141–147, 2003.

VOLPICELLI, L. A.; LEVEY, A. I. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. **Progress in Brain Research**, v. 145, p. 59-66, 2004.

WALL, P. M.; FLINN, J.; MESSIER, C. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.155, n.1, p. 58-68, 2001.

WALKER, D.L.; DAVIS, M. Involvement of NMDA receptors within the amygdala in short- versus long-term memory for fear conditioning as assessed with fear-potentiated startle. **Behavioral Neuroscience**, v.114, p.1019–1033, 2000.

WESS, J.; EGLIN, R. M.; GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.6, n.9, p. 721-33, 2007.

WILLETTS, J.; BALSTER, L.; LEANDER, J.D. The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. **Trends Pharmacological Sciences**, v.11, p.423–428. 1990.

WITTCHEN, H. U.; JACOBI, F.; REHM, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; JONSSON, B.; OLESEN, J.; ALLGULANDER, C.; ALONSO, J.; FARAVELLI, C.; FRATIGLIONI, L.; JENNUM, P.; LIEB, R.; MAERCKER, A.; VAN OS, J.; PREISIG, M.; SALVADOR-CARULLA, L.; SIMON, R.; STEINHAUSEN, H.C. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v.21, n.9, p.655-679, 2011.

WITTCHEN, H. U.; JACOBI, F. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of studies. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, n.4, p.357-376, 2005.

ANEXO A – Aprovação de projeto de mestrado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

4/4/14

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe9931e868325702e0075533b/e6dba36a94fb11eb83257adb006aa0aa?OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00798

Título

METODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA

Data de Entrada

11/09/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

21/12/2012

Considerações

Ofício nº 126/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- RECURSO aprovado ad referendum por quatro anos, para a utilização de sete mil ratos (*Rattus Norvegicus*) e doze mil camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: BIC-UFSC

Revoga-se o Ofício nº 108/CEUA/PRPE/2012

Data/Prazo:

01/11/2012

Considerações:

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou pelo indeferimento devido a várias inconsistências no preenchimento do protocolo.

A CEUA recomenda a observação dos pareceres em anexo quando da submissão de um novo protocolo de modo a facilitar sua apreciação.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 21/03/2016



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

