

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO NO
HIPOCAMPO VENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Sidarta Corrêa Bueno

Florianópolis

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Sidarta Corrêa Bueno

**AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO NO
HIPOCAMPO VENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

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

Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Flavia Ribeiro

Florianópolis

2011

Sidarta Corrêa Bueno

**AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO NO
HIPOCAMPO VENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”, e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Florianópolis, 17 de Março de 2011.

Prof.^a, Cilene Dino de Oliveira, Dr.^a.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Moacir Serralvo Faria,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a. Maria Flavia Ribeiro,
Co-Orientadora
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a, Dr.^a. Eloisa Loss,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof., Dr. Alcir Dafre,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr^a. Marta Aparecida Paschoalini,
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha família, meu grande e
inesgotável laboratório de amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o grande criador e senhor do universo. Responsável pela fonte de toda obrigação moral.

Em segundo lugar, à minha família, fonte de amor, compreensão e apoio. Sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis, nunca permitindo que eu tirasse os olhos dos meus objetivos.

Agradeço ao meu mestre e orientador Moacir Serralvo Faria pela oportunidade de chegar até aqui e pelo apoio na realização da pesquisa.

Aos verdadeiros amigos, pelas palavras de incentivo e carinho.

À Diana, Samuel, Wagner e Luigi meus sinceros agradecimentos pela amizade e grande ajuda prestada na execução da pesquisa.

Agradeço a professora Carla Inês Tasca pela ajuda e por permitir a utilização do laboratório de bioquímica A para realização da pesquisa.

À dona Vilma e seu Carlos pela amizade, longas conversas e serviços prestados.

Agradeço também aos meus amigos Jayme e Jandira pelos ensinamentos de vida e exemplo de determinação.

Aos colegas de trabalho, meus sinceros agradecimentos pelas conversas e pelas horas divididas dentro do laboratório.

Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro, que possibilitou a realização de um sonho.

A visão sem ação, não passa de um sonho.
A ação sem visão é só um passatempo.
A visão com ação pode mudar o mundo.”

(Martha Medeiros)

RESUMO

A disfunção hipocampal tem sido relacionada à fisiopatologia de transtornos de ansiedade, os quais podem envolver a neurotransmissão glutamatérgica. O presente estudo avaliou a captação de glutamato (GLU) em fatias do hipocampo ventral (HV) de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), um teste pré-clínico de ansiedade. Ratos Wistar machos foram submetidos ao LCE e tiveram a captação de GLU no HV (direito e esquerdo) avaliada imediatamente (“0h”) ou 24 horas após a exposição ao LCE (“24h”). O grupo “controle” não foi exposto ao LCE. A captação de GLU também foi avaliada no HV de ratos wistar machos de curto tempo de braço aberto (CTBA) e longo tempo de braço aberto (LTBA). Os resultados mostraram que o grupo “24h” apresentou uma redução na captação de glutamato apenas no hipocampo ventral direito, em relação aos grupos “controle” e “0h”, sugerindo que uma maior oferta de glutamato na fenda sináptica pode superestimular seus receptores no hipocampo ventral direito e facilitar a ocorrência de ansiedade após a exposição ao LCE. Não houve diferença entre a captação de GLU no HV (direito e esquerdo) de ratos CTBA e LTBA, indicando que a captação de GLU no HV não explica a variabilidade individual no tocante ao nível de ansiedade em ratos. Também não foi demonstrado correlação entre o comportamento de avaliação de risco, percentual de tempo de permanência no braço aberto e percentual de entradas nos braços abertos do labirinto com a captação de glutamato. Os resultados são discutidos considerando-se a importância da captação de GLU na homeostasia sináptica e sua relação com transtornos psiquiátricos, tais como a ansiedade e a depressão.

Palavras-chave: ansiedade, hipocampo, labirinto em cruz elevado, captação de glutamato.

ABSTRACT

The hippocampal dysfunction has been implicated in anxiety pathophysiology, which may include alterations in glutamatergic neurotransmission. The present study aimed to evaluate the glutamate (GLU) uptake in the ventral hippocampus (VH) slices of rats submitted to the elevated plus maze (EPM), a pre-clinical test of anxiety. Male Wistar rats were exposed to the EPM and had its VH GLU uptake (right and left sides) measured immediately (“0h”) and 24 hours (“24h”) after a single EPM exposure. The “control” group was not exposed to the EPM. The GLU uptake evaluation was also carried out in the VH of rats characterized by short time open arm (CTBA) and long time open arm (LTBA) behavior. The data showed that the 24h group exhibited decreased GLU uptake only in the right VH in relation to the control and 0h groups, suggesting that an increased GLU availability may over stimulate its receptors in the VH and be permissive to the occurrence of anxiety after the EPM exposure. There was no difference between GLU uptake in the VH (right and left) in CTBA and LTBA rats, indicating that VH GLU uptake does not underlie the individual variability regarding the level of anxiety in rats. Also, no correlation was demonstrated between the risk assessment behavior, the percentage of time spent in open arm entries and percentage of open arms of the maze with the glutamate uptake. The data are discussed by taking into account the importance of GLU in the synaptic homeostasis and its relation in the development of psychiatric disorders, such as anxiety and depression.

Keywords: anxiety, hippocampus, elevated plus-maze, glutamate uptake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Neurotransmissão Glutamatérgica	31
Figura 2 – Labirinto em Cruz Elevado	36
Figura 3 – Luminosidade no LCE	37
Figura 4 – Captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos submetidos ao labirinto em cruz.....	42
Figura 5 – Avaliação de risco em ratos de longo tempo de braço aberto (LTBA) e curto tempo de braço aberto (CTBA)	44
Figura 6 – Captação de glutamato no hipocampo ventral (HV) direito e esquerdo em ratos de longo tempo de braço aberto (LTBA) e curto tempo de braço aberto (CTBA)	45
Figura 7 – Captação de glutamato em ratos de longo tempo de braço aberto (LTBA) e curto tempo de braço aberto (CTBA) no hipocampo ventral esquerdo (HVE) e direito (HVD).	47
Figura 8 – Correlação entre captação de glutamato e %TBA, %EBA e AV. RISCO.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados do teste ANOVA de duas vias indicando os efeitos principais e interação entre fatores para a captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado .. 41

Tabela 2- Perfil comportamental de ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto no labirinto em cruz elevado (LCE) 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EBA - Percentual de Entradas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.

%TBA - Percentual de Tempo de permanência nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.

ANOVA - Análise de Variância.

CID-10 - Código Internacional de Doenças – 10ª edição.

CTBA – Curto Tempo de Braço Aberto

DPM - Distúrbios Psiquiátricos Menores.

DSM-III - Manual de Diagnóstico e Estatística das Desordens Mentais, (3ª edição).

DSM-IV - Manual de Diagnóstico e Estatística das Desordens Mentais (4ª edição).

EBA - Número de Entradas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.

EBF - Número de Entradas nos Braços Fechados do Labirinto em Cruz Elevado.

ECA - Estudo da Área de Captação Epidemiológica do Instituto Nacional de Saúde Mental.

EMB - Estudo Multicêntrico Brasileiro de Morbidade Psiquiátrica.

GLU - Glutamato

HV - Hipocampo Ventral

HVE – Hipocampo Ventral Esquerdo

HVD – Hipocampo Ventral Direito

LCE - Labirinto em Cruz Elevado.

LTBA – Longo Tempo de Braço Aberto

NCS-R - Estudo Nacional de Comorbidade – Replicação.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

TA - Transtorno de Ansiedade.

TAG - Transtorno de Ansiedade Generalizada.

TOC - Transtorno Obsessivo-Compulsivo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Aprendizagem emocional e ansiedade	21
1.2	Centro anatômico do medo/ansiedade: papel do hipocampo	24
1.3	Labirinto em Cruz Elevado	26
1.4	A neurotransmissão glutamatérgica e a ansiedade	29
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Animais.....	34
4.2	Labirinto em Cruz Elevado	35
4.3	Avaliação da captação de glutamato em fatias de estruturas cerebrais	38
4.4	Procedimentos.....	39
4.4.1	Experimento 1.....	39
4.4.2	Experimento 2.....	39
4.5	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Experimento 1: Efeito da exposição ao LCE sobre a captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos	41
5.2	Experimento 2: Captação de glutamato no hipocampo ventral em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto.....	42
5.2.1	Análise comportamental em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto	42
5.2.2	Captação de glutamato em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto	44
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aprendizagem Emocional e Ansiedade

A partir do final do século XIX até os dias de hoje muitas teorias foram criadas e aprimoradas na tentativa de conceituar o que é emoção. Embora existam muitas definições a respeito do seu conceito, é aceito que as experiências emocionais que nós percebemos, entre elas o medo, refletem uma intercomunicação entre centros encefálicos superiores, como o córtex cerebral, e regiões subcorticais (Schwartz et al., 2003). As emoções são mediadas por um conjunto de respostas periféricas, autonômicas, endócrinas e esquelomotoras, permitindo ao indivíduo confrontar situações da forma mais eficaz e adaptativa (Schwartz et al., 2003). As escolhas das respostas frente aos estímulos são determinadas pelas situações e história de cada indivíduo (Tomaz e Giugliano, 1997).

A formação de memórias associadas com experiências emocionais particulares permite que um indivíduo antecipe a ocorrência de eventos semelhantes no futuro, facilitando o comportamento de aproximação aos recursos e ao comportamento de esquiva de riscos, exigindo uma discriminação efetiva entre os sinais de segurança e os sinais de perigo a ser adaptável (Gillespie e Ressler, 2005). Se o comportamento de aproximação ou esquiva torna-se deficiente, excessivo ou inadequadamente ligado com as contingências do ambiente externo ou do meio interno do indivíduo, é possível a ocorrência de uma resposta inadequada às solicitações de adaptação.

Nesse contexto encontram-se os transtornos de ansiedade, caracterizados pela presença de ansiedade mal-adaptativa ou medo, os quais são as doenças psiquiátricas mais prevalentes e de maior comorbidade (Greenberg et. al., 1999). A ansiedade patológica, manifestada nos

transtornos de ansiedade, se distingue clinicamente da ansiedade normal em termos de intensidade (resposta ansiosa que ocorre fora da proporção à ameaça), duração (torna-se contínua na vida do indivíduo) e interferência com a vida funcional (prejudica o desempenho no trabalho e nas relações familiares e sociais) (Antony and Swinson, 1996; Clement et al, 2002;. Finn et al.2003; Sandford et al, 2000). Muitos autores vêem a ansiedade patológica não como um estado único e separado da ansiedade normal, mas como uma expressão extrema dela (Finn et al., 2003;. Lesch, 2001; Sandford et al, 2000). Os transtornos de ansiedade podem ser definidos como um conjunto de problemas psicológicos, que incluem ansiedade excessiva, preocupação, medo e evitação (Antony and Swinson, 1996). Segundo o Manual de Estatística e Diagnóstico dos Transtornos Mentais, DSM-IV-TR (APA, 2000), os transtornos de ansiedade são classificados em ataque de pânico; transtorno de pânico com ou sem agorafobia; fobias específicas e fobia social; transtorno obsessivo-compulsivo; transtorno de ansiedade generalizada; transtorno de estresse pós-traumático; transtorno de estresse agudo; transtorno de ansiedade devido a uma condição médica, induzido por alguma substância ou sem outra especificação. Os transtornos de ansiedade, mesmo sendo classificados em várias categorias, não podem ser isolados uns dos outros, pois muitos dos seus comportamentos e sinais fisiológicos se sobrepõem (Finn et al, 2003;. Gross e Hen, 2004).

No ano de 1994, a OMS (Organização Mundial da Saúde) e pesquisadores da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard despertaram uma forte conscientização de que os transtornos mentais, entre eles os transtornos de ansiedade, representam um sério problema de saúde pública, afetando uma grande parte da população mundial (Lopez e Murray, 1998). Diante disso, alguns estudos têm contribuído para o levantamento de dados epidemiológicos sobre a ocorrência, distribuição e os fatores determinantes dos eventos relacionados aos transtornos de ansiedade. O fornecimento desses dados possibilita, através de um planejamento, traçar medidas indicadas e eficientes de prevenção e controle de determinadas doenças, garantindo uma assistência adequada à saúde mental de indivíduos que sofrem desses transtornos. Entre esses estudos, podemos destacar a pesquisa realizada nos Estados Unidos pela ECA (Estudo da Área de Captação Epidemiológica do Instituto Nacional de Saúde Mental). Nesse estudo foi utilizada uma amostra total de cerca de 20 mil pessoas e os resultados indicam que um quarto das pessoas apresenta algum

transtorno de ansiedade em algum momento de sua vida, de acordo com os critérios do DSM-III (Eaton *et al.*, 1989; Lima, 1999).

Em um estudo realizado por Lepine (2002), verificou-se que os transtornos de ansiedade são os transtornos psiquiátricos mais prevalentes, afetando preferencialmente jovens, com idade entre 25 e 44 anos, mulheres, com pouca escolaridade, não-casados e sem filhos. Surpreendentemente, menos de 30% dos indivíduos que sofrem com os transtornos de ansiedade procuram tratamento. Outro estudo, nos Estados Unidos, realizada pelo NCS-R (National Comorbidity Study Replication), mostra que a prevalência para transtornos de ansiedade representa 18,1% dos transtornos psiquiátricos. Dentro da mesma pesquisa, a fobia específica apresentou maior prevalência, com 8,7%, seguida pela fobia social (6,8%), transtorno de estresse pós-traumático (3,5%), transtorno de ansiedade generalizada (3,1%), transtorno obsessivo-compulsivo (1,0%), transtorno de ansiedade de separação (0,9%) e agorafobia (0,8%) (Kessler *et al.*, 2005).

No Brasil, assim como nos países da África, Ásia e Europa Oriental, existe uma grande lacuna de dados epidemiológicos sobre o perfil de morbidade psiquiátrica geral na população. Tal carência é facilmente entendida pela falta de bancos de dados organizados e confiáveis que permitam estas análises.

Na tentativa de mudar esse cenário, Almeida Filho e colaboradores (1997) realizaram o Estudo Multicêntrico Brasileiro de Morbidade Psiquiátrica (EMB) em três áreas urbanas brasileiras: Brasília, São Paulo e Porto Alegre, respeitando os critérios diagnósticos do DSM-III. Esses autores constataram uma prevalência para transtornos de ansiedade de 12,1% em Brasília, 6,9% em São Paulo e 5,4% em Porto Alegre. Segundo o mesmo estudo, a ansiedade e as fobias constituem os principais problemas de saúde mental da população brasileira, com prevalências globais variando de 8% a 18% e estimativas de demanda potencial variando de 5% a 12%. Andrade e colaboradores (2002) realizaram outro estudo de prevalência de distúrbios psiquiátricos menores pela CID-10 em São Paulo (DPM-SP). Nesse estudo foram avaliados 1.464 indivíduos, com dados apontando prevalência para a vida de transtorno de ansiedade generalizada (TAG) de 4,2%, transtorno de pânico de 1,6%, agorafobia de 2,1%, fobia simples de 4,8%, fobia social de 3,5% e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) de 0,3%.

Ainda é importante ressaltar, que por trás dos transtornos de ansiedade estão grandes custos pessoais e sócio-econômicos. Estima-se que o gasto em saúde pública nos Estados Unidos com esses transtornos

seja superior a 67 bilhões de dólares por ano, em custos diretos (tratamento psiquiátrico e não-psiquiátrico, internação, pronto atendimento e medicamentos) e indiretos (redução de produtividade e abstenção no trabalho) (Antony & Swinson, 1996; Greenberg et al., 1999; Lepine, 2002).

Diante do exposto acima, cresce o interesse na descoberta dos mecanismos envolvidos na gênese da ansiedade, com a finalidade de tornar o diagnóstico cada vez mais preciso, evitando grandes custos sócio-econômicos e pessoais, além da possibilidade de oferecer melhores tratamentos aos indivíduos que sofrem com estes transtornos complexos.

1.2 Centro anatômico do medo/ansiedade: papel do Hipocampo

Devido à sua complexidade, os transtornos de ansiedade sugerem que numerosas áreas do cérebro estão envolvidas. As regiões cerebrais associadas com a ansiedade tem sido identificadas através de numerosos estudos com lesões e microinjeções em animais e de neuroimagem em humanos (Gordon & Hen, 2004). As respostas fisiológicas são mediadas por estruturas como o Locus Ceruleus (LC), a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o hipotálamo (Sandford *et al.*, 2000). Outras estruturas como a amígdala e a formação septo-hipocampal medeiam a resposta prática aos estímulos ansiogênicos (Sandford *et al.*, 2000). As regiões corticais superiores são responsáveis por controlar tanto as áreas responsáveis pelas respostas fisiológicas quanto controlar as áreas responsáveis pela resposta prática, além de ser responsável pelo processamento cognitivo (Sandford *et al.*, 2000). Propõe-se que a função básica dessas estruturas é avaliar a ameaça para situações individuais e selecionar respostas, de modo que comportamentos defensivos adequados sejam gerados (Charney et al., 1996).

Para Gray e McNaughton (2000), a ansiedade está relacionada com a ativação de um sistema de inibição comportamental, representado principalmente por estruturas que formam o sistema septo-hipocampal, nas quais encontramos o nosso objeto de estudo: o hipocampo. Esse sistema seria importante no controle do comportamento, especialmente quando há necessidade de movimento na direção da fonte de perigo, o que pode ser representado pela existência de conflito entre obter a

segurança e satisfazer a tendência de aproximação. A função desse sistema é inibir o comportamento em andamento, fazendo uma avaliação do grau de ameaça enquanto ocorre uma exploração cautelosa do ambiente. Segundo os mesmos autores, a ativação do sistema de inibição comportamental ocorre de maneira conjunta com o sistema de aproximação comportamental, colocando o animal em uma situação de conflito aproximação/ esquivar. A resultante do grau de ativação de um e outro sistema pode ocasionar a inibição do comportamento em curso e/ou favorecer a exploração cautelosa do ambiente, possibilitado pelo aumento no sistema de alerta bem como no comportamento de avaliação de risco. Essas respostas são submetidas a uma análise e posterior associação com informações armazenadas na memória.

O hipocampo tem sido implicado no processamento do contexto nos quais as informações são apresentadas, e desse modo modulando as respostas de defesa (LeDoux, 2000). Dados na literatura mostram que o hipocampo está envolvido criticamente na aquisição e evocação das experiências emocionais. A plasticidade sináptica que ocorre no hipocampo está envolvida com o processamento de informações, e é modulada pela amígdala (Mcgaugh, 2000), especialmente durante situações de estresse (Kim et al. 2001; Akirav et al. 2002). A comunicação amígdala-hipocampo seria importante para a expressão de memórias relacionadas ao medo (Seindenbecher et al. 2003).

Alguns estudos utilizando lesões cerebrais mostram que funcionalmente o hipocampo pode ser dividido em duas regiões, utilizando como referência o eixo septotemporal. Essas duas regiões são denominadas de hipocampo ventral e hipocampo dorsal, cada uma envolvida com diferentes comportamentos (Bannerman et al., 2004). Segundo Bannerman e colaboradores (1999), o hipocampo dorsal pode ser definido como 50% do total do hipocampo, começando pelo pólo septal ou dorsal, que corresponde ao hipocampo posterior em humanos, enquanto o hipocampo ventral corresponde à outra metade, que começa no pólo ventral ou temporal que em humanos é chamado de hipocampo anterior. Acredita-se que essas diferenças funcionais podem ser atribuídas às diferenças nas projeções aferentes e eferentes. Enquanto o hipocampo dorsal possui conexões neuronais com o córtex de associação, áreas corticais sensoriais primárias e áreas entorinais e peririnais (Moser e Moser, 1998), o hipocampo ventral possui conexões com o córtex pré-frontal, assoalho da estria terminalis, amígdala e estruturas subcorticais associadas com o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Petrovich et. al., 2001).

Segundo McHugh e colaboradores (2004), a região ventral do hipocampo está intimamente associada com a amígdala. Essa região emite e recebe projeções neuronais para os núcleos basais e laterais da amígdala. Estas diferenças funcionais também podem ser vistas através de estudos com roedores. Tem sido demonstrado que lesões no pólo ventral do hipocampo reduzem as reações de defesa de medo incondicionado sugerindo uma participação dessa região no controle do estado emocional de ratos, enquanto a região dorsal do hipocampo está mais envolvido com a memória espacial (Bannerman et al., 2004).

Além disso, alguns estudos demonstram que lesões no hipocampo estão associadas à diminuição da concentração dos níveis plasmáticos de corticosterona em animais expostos a situações estressantes. Como os níveis de corticosterona refletem os níveis de estresse estes resultados sugerem que o hipocampo tem um papel importante na mediação da resposta ao estresse. Lesões na região septo-hipocampal, portanto, parecem produzir o mesmo efeito de ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos (Gray e McNaughton, 2000).

Afora sua divisão em hipocampo ventral e dorsal, existe ainda a diferenciação do hipocampo quanto sua lateralidade. Ao hipocampo direito tem sido atribuído a função de representação espacial, ao passo que o hipocampo esquerdo estaria mais relacionado a memória de palavras, pessoas ou objetos.

Dessa forma, a disfunção do hipocampo tem sido relacionada com a fisiopatologia da ansiedade como uma possível consequência da má percepção do contexto de estímulos potencialmente ameaçadores (Carobrez et al., 2001).

1.3 Labirinto em Cruz Elevado

Determinadas experimentações específicas como os “modelos animais” são utilizados para gerar em animais reações comportamentais e humorais. Esses modelos animais têm sido largamente empregados com a finalidade de se obter parâmetros indicativos referentes aos estímulos induzidos nos indivíduos. Nesse contexto, os modelos animais são utilizados para avaliar padrões comportamentais bem esclarecidos na literatura, tornando possível determinar os substratos neurais envolvidos nos processos de aprendizagem emocional e ansiedade.

Um modelo animal útil para investigar se habilidades de aprendizado, sensibilidade à dor, ou a resposta a fármacos estão relacionados ao estado emocional, envolve a caracterização dos indivíduos de acordo com suas respostas no labirinto em cruz elevado (LCE), desenvolvido por Handley e Mithani em 1984. Utilizado inicialmente como modelo animal de ansiedade para roedores, tornou-se ao longo do tempo o mais utilizado de todos os modelos animais atualmente disponíveis (Rodgers & Cole, 1994). Entre os principais motivos que impulsionaram sua larga utilização estão: o baixo custo do equipamento, é um teste rápido e simples de aplicar e detecta os efeitos agudos dos fármacos ansiolíticos. (Rodgers e Dalvi, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005).

Sua funcionalidade baseia-se na avaliação do comportamento exploratório dos roedores em um ambiente novo, capaz de gerar um conflito entre duas tendências opostas: a atividade exploratória espontânea e a aversão natural do animal pelos braços abertos e iluminados (Barnett, 1963; Fernandes e File, 1996; Pereira et al, 2005; Treit et al., 1993). Esse conflito é considerado análogo à ansiedade humana (Gray, 1988). De forma que, do ponto de vista etológico, estes animais preferem os lugares fechados, que poderiam representar lugares virtualmente “seguros”. Assim, os níveis de ansiedade podem ser detectados no LCE através das esquivas aos braços abertos, representadas por variáveis como percentual de entrada e percentual de tempo de permanência nos braços abertos. O número de entradas nos braços fechados é utilizado como parâmetro de avaliação da atividade motora (Pellow et al., 1985; Rodgers & Cole, 1994).

Como modelo animal, o LCE tem sido amplamente validado utilizando critérios fisiológicos, farmacológicos e comportamentais (Lister, 1990; Pellow et al., 1985). A resposta a fármacos pode ser vista através de vários dados publicados, mostrando que drogas do tipo Benzodiazepínicos e outros compostos ansiolíticos promovem um aumento no percentual de entrada e no tempo de permanência dos braços abertos do Labirinto. Em contrapartida, compostos ansiogênicos produzem o efeito contrário (Menard & Treit, 1999; Pellow et al., 1985; Rodgers & Cole, 1994).

Dados encontrados na literatura mostram também que o confinamento dos animais aos braços abertos do LCE produz um aumento significativo dos comportamentos relacionados à ansiedade (defecação, congelamento) e da concentração de corticosterona plasmática quando comparados ao confinamento aos braços fechados (Pellow et al., 1985).

Desde sua criação em 1984, alguns parâmetros de avaliação foram adicionados ao modelo, como por exemplo, a análise “minuto a minuto” das variáveis comportamentais em camundongos (Rodgers et al, 1996) e em ratos (Rosa et al, 2000). Essa análise possibilitou avaliar os padrões comportamentais no decorrer de uma mesma exposição ao LCE. Nessa linha de pesquisa, Holmes e Rodgers (1998) demonstraram que o padrão comportamental de camundongos expostos ao Labirinto em Cruz Elevado alterava-se no decorrer da sessão, o que era verificado por uma diminuição na exploração dos braços abertos no decorrer do tempo de exposição. Os mesmos resultados foram encontrados por Rosa (2000) e Pereira e colaboradores (2005), dessa vez trabalhando com ratos. Esses achados sugerem diferenças nos padrões comportamentais entre o início e o término da exposição ao LCE, indicando a presença de alteração comportamental induzida pela experiência prévia, ou seja, aprendizagem.

Um desses parâmetros comportamentais avaliados durante a exposição do animal ao LCE é capaz de evocar um comportamento chamado de avaliação de risco ou (“risk assessment”). A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo. Esse comportamento defensivo traduz o medo do animal em explorar um ambiente novo, produzindo no animal um estado de hipervigilância que também pode ser visto como um comportamento análogo aos apresentados por indivíduos ansiosos (BLANCHARD et al., 2001).

Uma série de estudos sugere que o principal elemento desencadeante da aquisição de esquiva dos braços abertos no LCE é a existência de dois ambientes conflitantes, representados pelos braços abertos e fechados do labirinto. (Bertoglio & Carobrez, 2000; Pereira et al, 2005). Dessa forma, o LCE tem sido utilizado como ferramenta para o estudo da emocionalidade e aprendizagem emocional (Rodgers et al, 1996; Rosa et al, 2000)). Sendo assim, quando expostos ao LCE, os padrões comportamentais de um rato podem estar sendo influenciados por diversos fatores, uns determinados pela reatividade emocional do indivíduo, outros determinados pela experiência prévia, condições ambientais e nível basal fisiológico do animal.

1.4 A neurotransmissão glutamatérgica e a ansiedade

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, contribuindo não somente para uma rápida neurotransmissão sináptica, mas também para processos complexos como aprendizado, memória, plasticidade e morte celular neuronal (Ozawa et al., 1998). A concentração de glutamato no citoplasma de neurônios glutamatérgicos é aproximadamente 5-10mm (Danbolt, 2001). Este é várias vezes maior do que qualquer outro aminoácido, e muito maior comparada a outros tipos de tecido. Devido a maior parte do glutamato estar localizado no citoplasma do terminal do axônio (2-3 vezes maior do que nos dendritos ou corpos celulares) é proposto que os terminais do axônio de alguma forma restringem o movimento de glutamato ou, mais provavelmente, sintetizam e utilizam o glutamato localmente. A síntese de glutamato local em terminais de axônio pode ser atribuída à localização de glutaminases, que são responsáveis pela síntese de mais glutamato neuronal (Marquez et al., 2009). Alguns estudos utilizando imunolocalização sugerem que glutaminases ou proteínas que interagem com glutaminase (PGI) estão associadas com mitocôndrias (Fisher, 2007), que são particularmente abundantes nos terminais dos axônios (Ly e Verstreken, 2006). Dessa forma, é provável que a abundância de glutamato nos terminais dos axônios é em decorrência do glutamato ser produzido na mitocôndria, que apresenta-se em grande quantidade nos terminais dos axônios.

Afora sobre o local onde é produzido o glutamato, é importante ressaltar que esse neurotransmissor exerce seu efeito excitatório através de uma variedade de receptores, que podem ser ionotrópicos (canais iônicos) como os receptores NMDA, AMPA e KA ou metabotrópicos (mGluR), receptores associados a proteína G que operam através de segundos mensageiros intracelulares (Kew & Kemp, 2005). Ao longo do tempo, esses receptores foram identificados através de estudos utilizando métodos farmacológicos e eletrofisiológicos em várias regiões do cérebro. (Charles et al., 2005).

Após ser liberado na fenda sináptica e ativar seus receptores, o glutamato é rapidamente removido do espaço extracelular pela captação celular, através de um mecanismo envolvendo predominantemente transportadores de glutamato (EAATs – *do inglês excitatory amino acid transporters*) sódio-dependentes, também chamados de transportadores de “alta afinidade” (Danbolt, 2001). O trabalho de captação do glutamato desempenhado por esses transportadores é de extrema

importância, uma vez que o acúmulo excessivo desse neurotransmissor no meio extracelular pode levar a uma super estimulação dos receptores glutamatérgicos, aumentando consequentemente a produção de espécies reativas e excitotóxicas de oxigênio/nitrogênio, levando à morte celular (Gegelashvili & Schousboe, 1997; Danbolt, 2001).

Dessa forma, o aumento excessivo da concentração de glutamato no meio extracelular estaria sendo o ponto de partida ou parte da cascata que levaria a danos cerebrais. Assim, o aparecimento de diversos transtornos neurológicos está sendo atribuído à disfunção dos transportadores de glutamato (Trotti, 2002). Apesar de existirem evidências relacionando a disfunção da captação de glutamato a transtornos neurológicos, seu envolvimento com processos de aprendizagem emocional e ansiedade carece de maior elucidação.

Esses transportadores são encontrados tanto em células astrocíticas (Lehre et al., 1995) como em terminais nervosos pré e pós-sinápticos (Danbolt et al., 2006) e podem ser divididos em cinco subtipos, identificados através de técnicas de clonagem. Três dos subtipos de transportadores foram identificados originalmente no cérebro de ratos, são eles: GLAST, GLT-1 e EAAC1. Nos humanos, seus homólogos são respectivamente EAAT1, EAAT2 e EAAT3 (Fig. 1.). Os subtipos de transportadores EAAT4 e EAAT5, possuem a mesma nomenclatura para ratos e humanos (Danbolt, 2001).

A localização de cada um dos subtipos de GLUTs difere conforme as diferentes regiões cerebrais. GLAST apresenta expressão de proteína e imunocoloração maiores no cerebelo, e níveis moderados em outras estruturas do prosencéfalo como o hipocampo. O subtipo GLT é expresso principalmente na região do prosencéfalo, particularmente no hipocampo, septo lateral, córtex cerebral, estriado e em menor proporção no cerebelo. Esses dois transportadores são, funcionalmente, os mais importantes transportadores de glutamato e estão localizados nos astrócitos, associados com sinapses excitatórias. EAAT3 é expresso em diferentes regiões do cérebro, mas em níveis muito baixos. Os transportadores EAAT4 e EAAT5, estão expressos exclusivamente no cerebelo e retina, respectivamente (Danbolt, 2001; Kanai e Hediger, 2004).

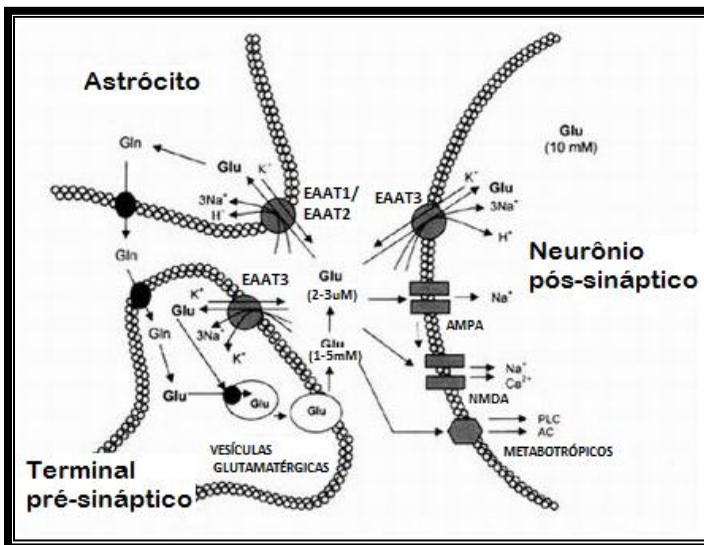


Figura 1 – Neurotransmissão glutamatérgica. Após sua ação sináptica o glutamato é captado por transportadores localizados nos neurônios (EAAT3) e nos astrócitos (EAAT1 e EAAT2), finalizando a ação da sinapse excitatória e mantendo baixa a concentração de glutamato extracelular.

Diversos estudos têm implicado a participação do sistema glutamatérgico na mediação das emoções e na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, bem como um possível alvo de intervenções terapêuticas. Exames de imagem em humanos, como a ressonância magnética (RM), têm sido utilizados para demonstrar a relação entre o glutamato e ansiedade. Alguns estudos com ressonância magnética volumétrica e ressonância magnética funcional (fMRI) mostram que regiões do cérebro ricas em glutamato, que têm sido implicados na expressão de medo e ansiedade, como hipocampo, amígdala, e córtex cingulado anterior, estão estruturalmente alteradas ou funcionalmente hiperativas em pacientes com diagnóstico de transtornos de ansiedade (Rauch et al.; Yamasue et al.)

Dados experimentais indicam que os receptores glutamatérgicos modulam a ansiedade em roedores. A injeção sistêmica ou central de antagonistas dos receptores NMDA produz efeitos ansiolíticos no LCE (Dunn et al. 1989; Guimarães et al. 1991; Karcz-Kubicha et al. 1997; Teixeira and Carobrez 1999; Carobrez et al. 2001), enquanto o glutamato e o NMDA induzem efeitos do tipo ansiogênicos

(Przegaliński et al., 1996). Animais knock-out para a subunidade NR2A dos receptores NMDA apresentam reduzido comportamento tipo ansioso em relação aos animais normais (Chenard, 1995).

A modulação da liberação de glutamato também influencia as medidas de ansiedade em roedores. Animais mGluR8^{-/-}, um receptor metabotrópico de glutamato pré-sináptico, apresentam aumento nos parâmetros de ansiedade (Duvoisin et al, 2005). Injeção intra-hipocampal ou intra-amigdalar de agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato do grupo II e III, que inibem a liberação do glutamato, apresentam efeito ansiolítico no LCE. A administração de antagonistas de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo I, que aumentam a liberação de glutamato, também apresentam efeito ansiolítico (Cortese et al, 2005). A adenosina é um neuromodulador que também pode atuar sobre a transmissão glutamatérgica. Estudos que avaliaram o comportamento exploratório em roedores demonstraram que agonistas e antagonistas de receptores A1 produzem efeitos ansiolíticos e ansiogênicos, respectivamente (Gimenez et al, 2002).

Apesar de serem encontradas diferenças nos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos com relação ao nível de ansiedade detectado no LCE, o papel do sistema glutamatérgico não está esclarecido. O tratamento com a D-cicloserina, um agonista parcial do sítio de ligação da glicina nos receptores NMDA tem efeito ansiogênico em ratos com alta ansiedade, sem produzir efeito sobre os de baixa ansiedade (Ledgerwood, 2003).

Em roedores, a exposição ao estresse acarreta um aumento significativo na liberação de glutamato em regiões envolvidas com o comportamento emocional, como o lócus coeruleus, o córtex frontal e o hipocampo (Moghaddam, 1993; Moghaddam et al, 1994; Singewald et al, 1995, 1996). Além disso, a exposição a situações de estresse aumenta a expressão dos receptores NMDA e os níveis dos seus RNAm no hipocampo e na área tegmental ventral de ratos (Bartanusz et al, 1995; Fitzgerald et al, 1996).

Os receptores AMPA são receptores ionotrópicos excitatórios de glutamato. Apresentam um papel importante na indução e manutenção da plasticidade sináptica e na aquisição da memória do medo (Isaac et al., 1997; Rumpel et al., 2005). Usando um modelo aprendizagem associativa, McKernan e colaboradores (1997) identificaram um potente mediador-AMPA da atividade dentro da amígdala nos ratos. Além disso, alguns estudos demonstram assimetrias hemisféricas no controle dos estados emocionais. Injeções de antagonistas dos receptores NMDA na amígdala direita diminuem o

comportamento do tipo ansioso em ratos, além de que níveis elevados de serotonina nessa região estão correlacionados à ansiedade elevada (Fendt, 2001; Carobrez et al., 2001). No entanto, não é claro se essa lateralização de função se estende a outras áreas límbicas, como o hipocampo.

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a neurotransmissão glutamatérgica tem sido amplamente estudada, com o objetivo principal de elucidar alguns mecanismos que levariam ao aparecimento de várias condições neuropsiquiátricas como: isquemia, doença de Alzheimer e esclerose amiotrófica lateral. (Lipton and Rosenberg, 1994). Além disso, disfunções no sistema glutamatérgico também estão envolvidas na origem de doenças como depressão, esquizofrenia (Carlsson et al., 1999; Berk et al., 2001; Belsham, 2001) e mais recentemente com transtornos de humor (McCullumsmith e Meador-Woodruff, 2002).

A captação glutamatérgica tem sido relatada como um mecanismo importante, que poderia estar participando nos processos de gênese dessas patologias. Entretanto, sua relação com a ansiedade não está esclarecida. Diante deste cenário, torna-se relevante um estudo bioquímico quantitativo da captação de glutamato, que está diretamente envolvida na homeostase de sinapses em estruturas cerebrais. O mau funcionamento desse mecanismo em estruturas como o hipocampo, onde sua região ventral têm sido amplamente estudada e relacionada com a memória emocional, poderia ser o ponto inicial ou parte da cascata que levaria à transtornos de ansiedade. Além disso, existe uma carência de estudos no que se refere ao controle hemisférico dessa estrutura nos estados emocionais, como os apresentados nos transtornos de ansiedade. Dessa forma, um melhor entendimento do funcionamento dessa estrutura pode ajudar a fornecer subsídios para a elaboração de um melhor diagnóstico e tratamento dos indivíduos acometidos por transtornos de ansiedade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a importância da captação de glutamato no hipocampo ventral sobre a emocionalidade de ratos em um teste pré-clínico de ansiedade.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos ingênuos e submetidos ao labirinto em cruz elevado.
- 2- Avaliar se a captação de glutamato no hipocampo ventral pode explicar a variabilidade individual (ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto representando alta e baixa ansiedade respectivamente) no tocante ao nível de ansiedade no labirinto em cruz elevado.
- 3- Verificar se existe correlação entre as variáveis: captação de glutamato e %TBA, captação de glutamato e %EBA, captação de glutamato e AV. RISCO no hipocampo ventral direito e hipocampo ventral esquerdo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 250 e 300g no dia do teste. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC, sendo submetidos a 7 dias de adaptação ao biotério do laboratório de Neurobiologia (BIO015, CFS), em grupos

de 5 ou 6 animais por caixa de polipropileno (49 X 34 X 16 cm), forrada com serragem com livre acesso à água e ração padrão. A temperatura foi mantida em $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas das 06:00 às 18:00h). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas (a cada 48 horas) e no dia das sessões experimentais, que foram realizadas na fase diurna (entre 11:00-16:00h).

O protocolo experimental estabelecido foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.2 Labirinto em Cruz Elevado

O LCE é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando assim uma cruz simétrica (quatro braços de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura). Dois braços opostos são fechados por laterais de 40 cm de altura, enquanto os braços restantes são abertos, circundados por uma pequena borda (1 cm) para reduzir a ocorrência de quedas. Na junção entre os quatro braços delimita-se uma área central de 100 cm². O labirinto como um todo, é elevado a 50 cm do solo (Fig. 2). Quatro lâmpadas fluorescentes (15 W cada), dispostas igualmente em forma de cruz, 100 cm acima do labirinto foram utilizadas como única fonte de iluminação do experimento. A luminosidade no labirinto foi obtida utilizando-se um luxímetro. O valor médio de lux em cada braço do labirinto foi mensurado através da divisão de cada braço do labirinto em cinco partes com posterior leitura de lux em cada uma dessas partes. O nível médio de lux em cada braço do labirinto, obtido através da média dos cinco valores encontrados, foi de 333 e 385 lux para os braços abertos e 291 e 283 lux para os braços fechados, totalizando um Δlux do labirinto de 72 (fig. 3).

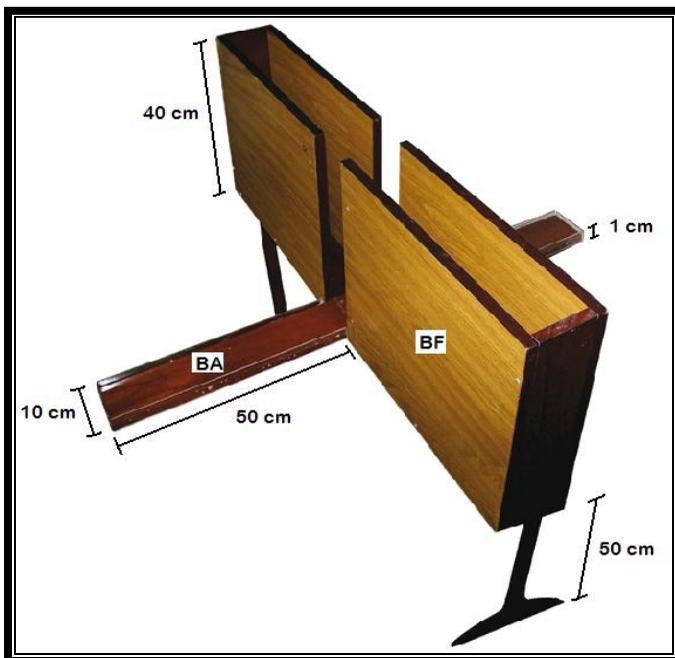


Figura 2- Labirinto em Cruz Elevado. BA representa os braços abertos do labirinto enquanto BF representa os braços fechados do labirinto

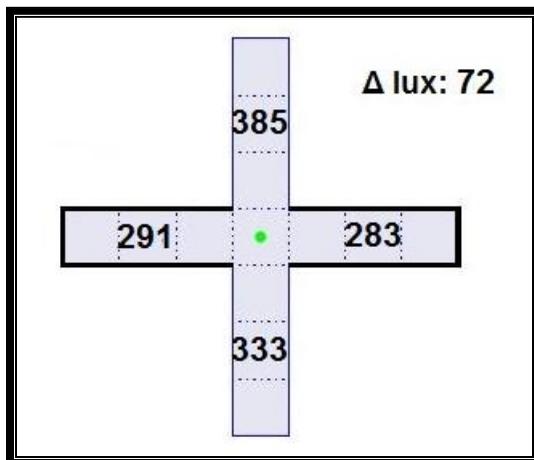


Figura 3- Luminosidade no LCE. Os valores representados em cada braço do LCE correspondem a média dos valores obtidos em cada braço.

O teste do Labirinto em Cruz Elevado consiste em colocar o animal no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados, sendo permitido explorar livremente o labirinto por 5 minutos.

Com a finalidade de evitar pistas odoríferas, após o término da exposição de cada animal, o LCE foi limpo com um pano umedecido em uma solução de álcool 70%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na exclusão do mesmo. Cada sessão foi filmada por uma WebCam e os comportamentos foram transcritos através do programa Etholog 2.2. (OTTONI, 2000).

As variáveis comportamentais foram representadas pela porcentagem de entrada (%EBA) e de tempo de permanência (%TBA) nos braços abertos, número de entrada nos braços fechados (EBF), número de entradas nos braços abertos do labirinto (EBA) e total de entradas nos braços do labirinto (TE). O critério de definição de entrada e saída de braço foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora de um braço, respectivamente.

A avaliação de risco foi avaliada no LCE utilizando-se como critério a contagem do número de estiramentos corporais protegidos do animal durante os 5 minutos de exploração no LCE, ou seja, quando o animal está no braço fechado e projeta seu corpo para o braço aberto de forma que apenas suas patas dianteiras e cabeça fiquem no braço aberto. Cada projeção corporal é contada como uma avaliação de risco.

4.3 Avaliação da Captação de Glutamato em fatias de estruturas cerebrais

Após serem expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (grupo “controle” não foi submetido ao LCE), todos os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus ventrais (direito e esquerdo) rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain e pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37°C, sendo gaseificadas com carbogênio. Após a incubação, as fatias de hipocampo foram lavadas por 15 min a 37 °C em uma solução salina balanceada de Hank (HBSS), composição em mM: 1,29 CaCl₂, 136,9 NaCl, 5,36 KCl, 0,65 MgSO₄, 0,27 Na₂HPO₄, 1,1 KH₂PO₄ e 5 HEPES. A captação de glutamato foi avaliada pela adição de 0,33 µCi / ml de L-glutamato [³H] com 100 mM de glutamato não marcado em um volume final de 300 µl. A incubação foi interrompida imediatamente após 7 min, descartando o meio de incubação e os cortes foram submetidos a duas lavagens geladas com 1 ml de HBSS sódio e três lavagens geladas com HBSS colina. As fatias foram solubilizados pela adição de uma solução com 300 µl de NaOH 0,1N/SDS 0,01 % e incubadas durante a noite. No dia seguinte, após estarem bem homogenizadas, alíquotas de 20 µl das fatias lisadas foram retiradas para determinação do conteúdo intracelular de L-glutamato [³H] por cintilação. A captação realizada pelos transportadores de “baixa afinidade” ou sódio-independente foi determinada utilizando cloreto de colina na HBSS, em vez de cloreto de sódio na HBSS para obtenção da captação de glutamato por transportadores de “alta afinidade” ou sódio-dependente. A captação sódio-independente foi subtraído do total de captação para obter a captação específica de glutamato sódio-dependente. Para um melhor entendimento, esse cálculo foi expresso em forma de duas fórmulas, que podem ser visualizadas abaixo:

- **Capt. Específica = Capt. Inespecífica – Capt. Total**
- **Capt. Na⁺ dependente = Capt. Na⁺ independente - Capt. Total**

Os resultados foram expressos como nanomoles de L-glutamato [^3H] retomada por miligrama de proteína por minuto. Esse resultado nos informa a quantidade, em mg, de proteína que atravessou a membrana celular por minuto.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Experimento 1:

Dois grupos de animais foram submetidos ao LCE conforme descrito no item 4.2 e tiveram a captação de glutamato avaliada no hipocampo ventral (direito e esquerdo), conforme descrito no item 4.3. No primeiro grupo a captação de glutamato foi avaliada imediatamente após a exposição ao LCE (Grupo 0h, n=9), enquanto que no segundo grupo, a captação de glutamato foi realizada 24 horas após a exposição ao labirinto (Grupo 24h, n=12). No grupo 24h, os animais foram retirados do LCE e levados a sua caixa de origem, junto ao biotério do laboratório de neurobiologia até o momento da avaliação da captação de glutamato. Um terceiro grupo de animais não foi exposto ao LCE, mas teve a captação de glutamato hipocampal avaliada conforme descrito no item 4.3 (grupo controle, n=10). Em todos os grupos a decapitação foi realizada em uma sala localizada ao lado da sala onde os animais foram expostos ao LCE. Cada sessão de testes bioquímicos foi composta por um animal de cada grupo, sendo um animal do grupo “controle”, um do grupo “0h” e outro animal do grupo “24h”. Esse experimento teve como objetivo avaliar se a exposição ao LCE poderia alterar a captação de glutamato no hipocampo ventral dos animais.

4.4.2 Experimento 2:

Um grupo de animais foi submetido ao LCE conforme descrito no item 4.2. De acordo com a mensuração de tempo de permanência nos braços abertos do LCE (expressos como %TBA), os animais foram

divididos em dois grupos, baseados em valores acima ou abaixo de 20% de %TBA, conforme descrito previamente pela literatura (Schwartz et. al., 1998; Ho et. al., 2002; Pawlak et. al., 2003). Os animais que ficaram acima desse valor foram considerados ratos de longo tempo de braço aberto ou baixa ansiedade (LTBA, n=10) e os que ficaram abaixo dessa média foram considerados ratos curto tempo de braço aberto ou alta ansiedade (CTBA, n=14). Essa divisão do grupo em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto teve como objetivo avaliar se os níveis basais de ansiedade representados por esses grupos poderiam estar relacionados com alterações na captação glutamatérgica nos hemisférios direito e esquerdo do hipocampo ventral. Após serem expostos ao LCE cada animal foi retirado do labirinto e devolvido à sua caixa de origem, junto ao biotério do laboratório de neurobiologia. No dia seguinte (24 horas após a exposição ao LCE) a captação de glutamato no hipocampo ventral (direito e esquerdo) foi avaliada conforme descrito no item 4.3.

4.5 Análise estatística

No experimento 1 os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (Fator 1 “*Grupo*” e fator 2 “*Hemisfério*”). No experimento 2 utilizou-se o teste t de student para a análise dos resultados dos grupos CTBA e LTBA e para análise do comportamento de avaliação de risco, sendo aceito a significância com $p < 0,05$. As comparações comportamentais entre os grupos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto foram feitas através de ANOVA de uma via. A significância foi aceita com $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Ainda foram utilizadas correlações lineares para avaliar os seguintes parâmetros: captação GLU e %TBA, captação e %EBA e captação e avaliação de risco, sendo a significância aceita com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento1: Efeito da exposição ao labirinto em cruz sobre a captação de glutamato no hipocampo ventral (direito e esquerdo) de ratos:

A tabela 1 mostra os resultados gerais da ANOVA de duas vias para a captação de glutamato, indicando os efeitos principais e a interação entre os fatores. ANOVA revelou efeito principal significativo para o fator “Grupo”. O teste de Duncan indicou que no hipocampo ventral direito, o grupo 24h exibiu uma redução significativa da captação de glutamato em relação aos respectivos grupos Controle e 0h (Fig. 4). Quanto ao hipocampo ventral esquerdo, foi observado que o grupo 24h apresentou uma redução significativa na captação de glutamato apenas quando comparado ao respectivo grupo 0h (Fig 4). Não foi observado efeito principal significativo para o fator “Hemisfério”, nem interação entre os fatores “Grupo” e “Hemisfério”.

Tabela 1. Resultados do teste ANOVA de duas vias indicando os efeitos principais e interação entre fatores para a captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado.

<i>Grupo</i>	<i>F (2,54) = 8,18, p<0,05</i>
<i>Hemisfério</i>	<i>F (1,54) = 2,10, NS</i>
<i>Grupo/Hemisfério</i>	<i>F (2,54) = 0,92, NS</i>

Ratos Wistar foram submetidos ao labirinto em cruz (LCE) e tiveram a captação de glutamato no hipocampo ventral (hemisférios direito e esquerdo) avaliada imediatamente após (grupo 0h) e 24 horas (Grupo 24h) após a exposição ao labirinto. O grupo controle não foi exposto ao LCE. NS indica valores de probabilidade não significantes.

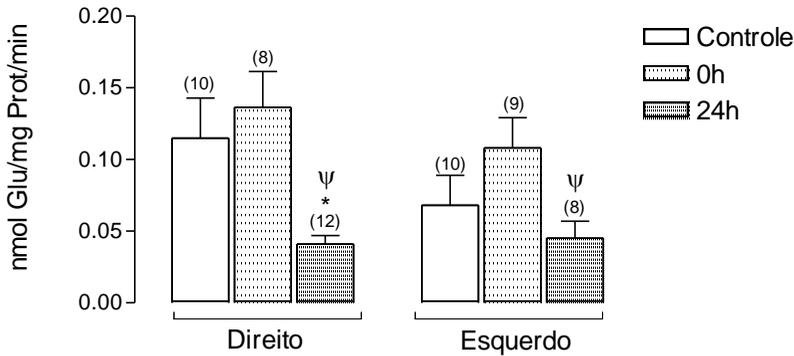


Figura 4. Captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos submetidos ao labirinto em cruz. A captação de glutamato foi realizada imediatamente após (Grupo 0h) ou 24h após a exposição ao labirinto em cruz. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. Ψ $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo 0 (ANOVA seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

5.2 Experimento 2: Captação de glutamato no hipocampo ventral (direito e esquerdo) em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto.

5.2.1. Análise comportamental em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto.

Na tabela 2 pode ser observada a existência de padrões comportamentais distintos entre os grupos LTBA e CTBA. Ratos do grupo LTBA exibiram maior exploração dos braços abertos do LCE, em relação a ratos do grupo CTBA, visto que apresentaram maior %EBA ($F_{1,22} = 20,46$, $p < 0,05$), %TBA ($F_{1,22} = 47,86$, $p < 0,05$) e EBA ($F_{1,22} = 28,86$, $p < 0,05$). Em relação ao número de entrada nos braços fechados do LCE, não houve diferença entre os grupos CTBA e LTBA ($F_{1,22} = 0,24$, NS).

Tabela 2. Perfil comportamental de ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto no labirinto em cruz elevado (LCE).

Variável	Grupo CTBA (n=14)		Grupo LTBA (n=9)	
	Média	EPM	Média	EPM
%EBA	25,82	4,17	50,27 *	2,54
%TBA	6,94	1,56	28,85 *	3,06
EBA	2,14	0,40	6,90 *	0,88
EBF	6,42	0,84	7,10	1,0

Os animais foram submetidos ao LCE por 5 min e a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TBA) foi calculada para cada animal. Os animais que exibiram %TBA abaixo de 20% foram denominados animais de curto tempo de braço aberto (CTBA, n=14), enquanto que animais exibindo %TBA acima de 20% foram considerados de longo tempo de braço aberto (LTBA, n=9). %EBA, Porcentagem de entrada nos braços abertos; EBA, número de entrada nos braços abertos; EBF, número de entrada nos braços fechados; AV. RISCO, número de avaliações de risco. EPM indica Erro Padrão da Média. * p<0,05 (ANOVA).

Na figura 5 estão indicados os resultados do teste t de student para a avaliação de risco entre os grupos CTBA e LTBA. Em média, ratos CTBA (2.714 ± 0.4249 n=14) e LTBA (2.000 ± 0.6455 n=9) não apresentam diferenças relacionadas ao número de comportamento de avaliação de risco quando expostos ao labirinto em cruz elevado, $t(0.9663) = 21$, $p = 0,3449$.

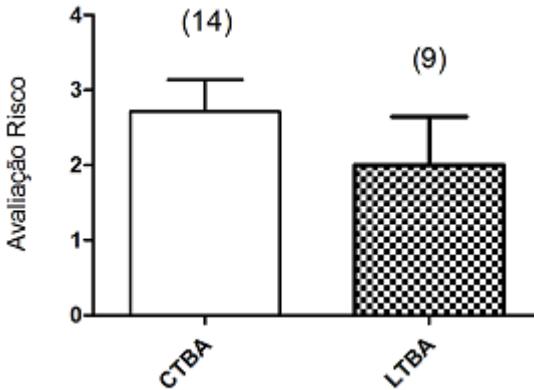


Figura 5. Avaliação de risco em ratos de longo tempo de braço aberto (LTBA) e curto tempo de braço aberto (CTBA). Os animais foram submetidos ao labirinto por 5 min e a %TBA foi calculada para cada animal. Os animais que exibiram %TBA abaixo de 20% foram denominados animais de curto tempo de braço aberto (alta ansiedade, n=14), enquanto que animais exibindo %TBA acima de 20% foram considerados de longo tempo de braço aberto (baixa ansiedade, n=9). Os comportamentos de avaliação de risco foram registrados durante a exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. O teste t de student não revelou diferença estatística significativa no número de comportamentos de avaliação de risco para os grupos CTBA e LTBA.

5.2.2. Captação de Glutamato em ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto

A figura 6 indica os resultados do teste t de Student para a captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto. O teste t não indicou diferença estatística significativa entre os hemisférios do hipocampo ventral para o grupo CTBA, $t(0.7506) = 24$, $p = 0.4602$. Em média os dois hipocampus apresentam a mesma captação de glutamato, hipocampo esquerdo (0.06740 ± 0.01631 n=12); hipocampo direito (0.09468 ± 0.03054 n=14). Para o grupo LTBA o teste t de student também não indicou diferença estatística significativa para a captação de glutamato nos hemisférios do hipocampo ventral, $t(1.809) = 15$, $p =$

0,0905. Hipocampo esquerdo (0.1192 ± 0.03268 n=8); hipocampo direito (0.05687 ± 0.01468 n=9).

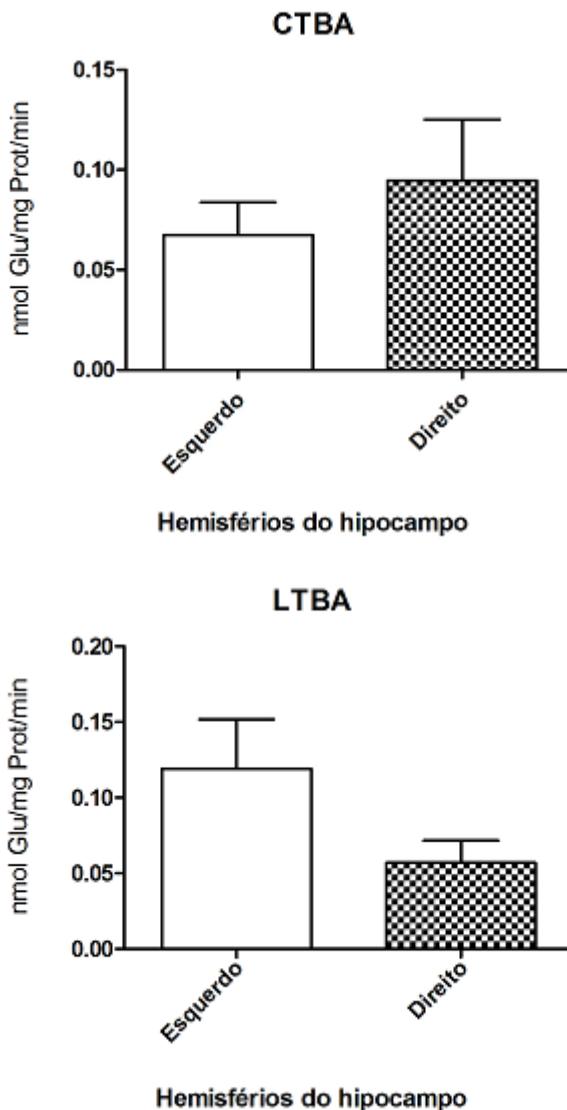


Figura 6. Captação de glutamato no hipocampo ventral (HV) direito e esquerdo em ratos de longo tempo de braço aberto (LTBA) e curto tempo

de braço aberto (CTBA). Os animais foram submetidos ao labirinto por 5 min e a %TBA foi calculada para cada animal. Os animais que exibiram %TBA abaixo de 20% foram denominados animais de curto tempo de braço aberto (alta ansiedade, n=14), enquanto que animais exibindo %TBA acima de 20% foram considerados de longo tempo de braço aberto (baixa ansiedade, n=9). A captação de glutamato foi realizada 24 horas após a exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. O teste t de student não revelou diferença estatística significativa na captação de glutamato nos hemisférios hipocâmpais para os grupos CTBA e LTBA.

Na figura 7 estão indicados os resultados do teste t de Student para a captação de glutamato no hipocampo ventral esquerdo e direito de ratos de curto tempo de braço aberto e longo tempo de braço aberto. O teste t não indicou diferença estatística significativa na captação de glutamato no hipocampo ventral esquerdo (HVE) de ambos os grupos CTBA (0.06740 ± 0.01631 n=12) e LTBA (0.1192 ± 0.03268 n=8), $t(1.561) = 18$, $p = 0,1358$. Em média, tanto ratos de curto tempo de braço aberto quanto os de longo tempo de braço aberto possuem a mesma captação de glutamato no hipocampo ventral esquerdo. O mesmo ocorreu para o hipocampo ventral direito (HVD), onde ratos CTBA (0.09468 ± 0.03054 n=14) e ratos LTBA (0.05687 ± 0.01468 n=9) em média não apresentaram diferenças na captação de glutamato, $t(0.9424) = 21$, $p = 0,3567$.

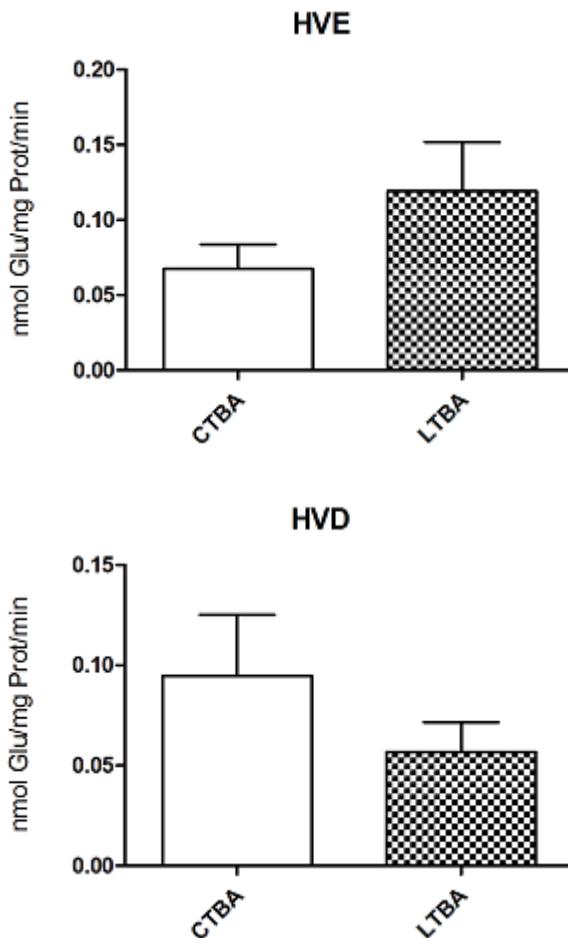


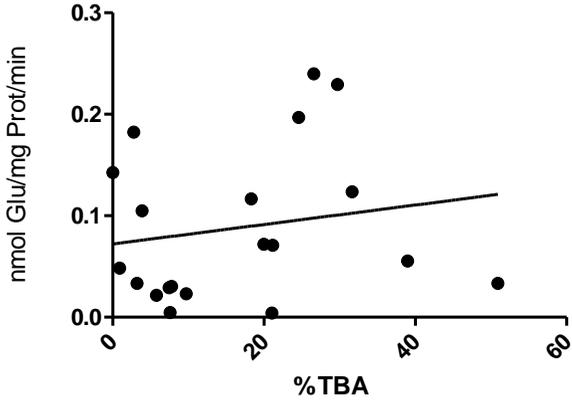
Figura 7. Captação de glutamato em ratos de longo tempo de braço aberto (LTBA) e curto tempo de braço aberto (CTBA) no hipocampo ventral esquerdo (HVE) e direito (HVD). Os animais foram submetidos ao labirinto por 5 min e a %TBA foi calculada para cada animal. Os animais que exibiram %TBA abaixo de 20% foram denominados animais de curto tempo de braço aberto CTBA (alta ansiedade, n=14), enquanto que animais exibindo %TBA acima de 20% foram considerados de longo tempo de braço aberto LTBA (baixa ansiedade, n=9). A captação de glutamato foi realizada 24 horas após a exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Números entre parênteses indicam o número de animais por grupo. O teste t de student não indicou

diferença estatística significativa na captação de glutamato entre os grupos CTBA e LTBA no hipocampo esquerdo e direito.

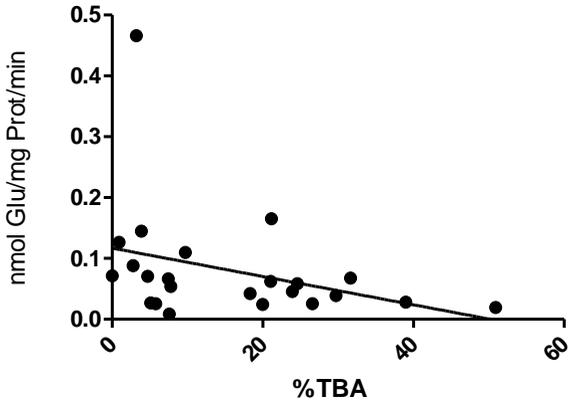
A figura 8 indica uma correlação linear entre a captação de glutamato no hipocampo ventral esquerdo e hipocampo ventral direito em relação ao percentual de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto (%TBA), percentual de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (%EBA) e número de avaliações de risco. As figuras estão representadas como 8A, 8B e 8C respectivamente. Os resultados não indicaram relação existente entre captação de glutamato e %TBA,%EBA e AV. RISCO. Significância aceita com $p < 0,05$.

A

Hipocampo Ventral Esquerdo

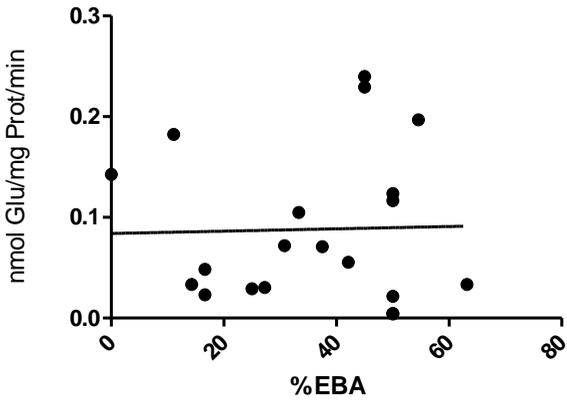


Hipocampo Ventral Direito

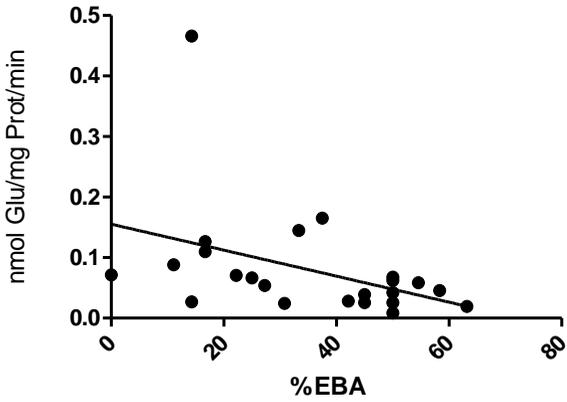


B

Hipocampo Ventral Esquerdo



Hipocampo Ventral Direito



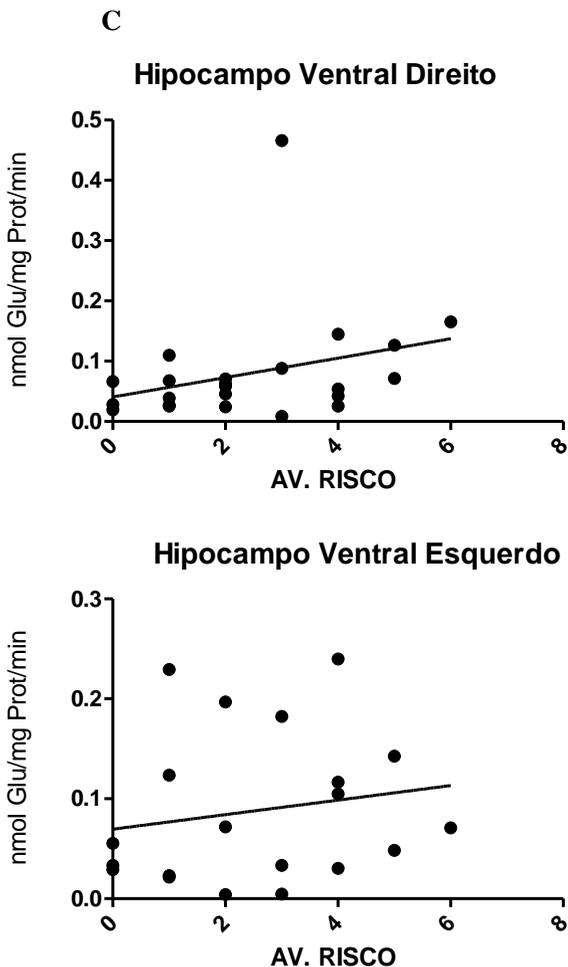


Figura 8. Correlação entre captação de glutamato e %TBA, %EBA e AV. RISCO. Figura 8A. Correlação entre captação de glutamato e percentual de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (%TBA). Os animais foram submetidos ao labirinto por 5 min (n=23) e a %TBA foi calculada para cada animal. Figura 8B. Correlação entre captação de glutamato e percentual de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (%EBA). Os animais foram submetidos ao labirinto por 5 min (n=23) e a %EBA foi calculada para cada animal. Figura 8C. Os animais foram submetidos ao labirinto por 5 min (n=23) e o número de avaliações de risco (AV. RISCO) foram calculadas para cada animal. Os resultados não indicaram

existência de correlação entre captação de glutamato no hipocampo ventral esquerdo, direito e %TBA, %EBA e AV. RISCO. A captação de glutamato foi realizada 24 horas após a exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado e a significância foi aceita com $p < 0,05$.

6 Discussão

Tem sido demonstrado na literatura que alterações no sistema glutamatérgico podem provocar efeitos tóxicos no sistema nervoso central de mamíferos causados pelo excesso de glutamato no meio extracelular. Quando superestimulados, os receptores de glutamato, principalmente o subtipo NMDA, estão associados a uma série de doenças neurológicas agudas e degenerativas como isquemia, doença de Alzheimer e esclerose amiotrófica lateral. (Lipton and Rosenberg, 1994). Além disso, disfunções no sistema glutamatérgico também estão envolvidas na origem de doenças como depressão, esquizofrenia (Carlsson et al., 1999; Berk et al., 2001; Belsham, 2001) e transtornos de humor (McCullumsmith e Meador-Woodruff, 2002).

Disfunções na neurotransmissão glutamatérgica também estão envolvidas em quadros de ansiedade (Cortese e Phan, 2005), inclusive aqueles caracterizados como distúrbios de aprendizagem emocional, tais como o distúrbio de estresse pós-traumático, ansiedade social e fobias específicas (Gillespie e Ressler, 2005). Em concordância com o acima exposto, os resultados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, que a exposição de ratos ao LCE, um teste pré-clínico de ansiedade, produziu mudanças neuroquímicas na captação glutamatérgica no hipocampo ventral dos animais. A experiência no LCE provocou uma diminuição na captação de glutamato no hipocampo ventral direito em relação aos animais controles, os quais não haviam sido submetidos ao LCE.

A captação glutamatérgica é um mecanismo chave envolvido na manutenção dos níveis adequados de glutamato no meio extracelular, garantindo o final do processo de transmissão sináptica (Danbolt, 2001). O presente estudo sugere que uma redução na captação do glutamato poderia participar na modulação da ansiedade em roedores submetidos ao LCE. De fato, tem sido amplamente demonstrado na literatura que a administração sistêmica de antagonistas dos receptores glutamatérgicos

do tipo NMDA induz efeito ansiolítico em roedores (Przegaliński et al., 1996; Corbett & Dunn, 1993; Corbett & Dunn, 1991; Dunn et al, 1989; Plaznik et al, 1994; Criswell et al, 1994; Engin et al, 2009). Embora tais administrações tenham sido de caráter sistêmico, impossibilitando afirmar qual local do sistema nervoso central reside o bloqueio ansiolítico dos receptores, a análise do comportamento de camundongos geneticamente modificados, com a eliminação da subunidade NR1 dos receptores NMDA nas células granulares do giro dentado, indica que os receptores NMDA localizados no hipocampo ventral podem ser o sítio do efeito ansiolítico da administração sistêmica de antagonistas NMDA (Barkus et al, 2010; Niewoehner et al, 2007).

Os resultados do presente estudo, mostrando a redução da captação de glutamato no hipocampo ventral de ratos submetidos ao LCE, sugerem que a maior oferta de glutamato poderia superestimular seus receptores no hipocampo ventral, facilitando a ocorrência ansiedade após a exposição ao LCE. A redução na captação do glutamato necessitou de tempo para ocorrer, pois foi observada somente 24 horas após a exposição ao LCE, e não imediatamente. Coincidentemente, tem sido amplamente demonstrado na literatura que a experiência prévia no LCE altera o comportamento dos animais durante uma segunda exposição. Durante a re-exposição ao LCE, usualmente 24 horas após a primeira, os animais exibem elevada ansiedade em relação à primeira exposição, o que caracteriza a ocorrência de um tipo de aprendizagem emocional durante a primeira exposição, que é motivada pelo medo dos braços abertos (Treit et al, 1993, File, 1993; Espejo, 1997; Rodgers et AL, 1996).

Infelizmente não temos como comprovar a ocorrência de tal aprendizagem porque os animais foram sacrificados para a leitura da captação de glutamato e, dessa forma, não puderam ser re-expostos ao labirinto em cruz elevado. Entretanto, nossos resultados sugerem que a redução na captação de glutamato pode ser permissiva para a ocorrência da aprendizagem emocional, na medida em que permite maior oferta de glutamato na fenda sináptica. Um estudo prévio na literatura aponta nessa direção, visto que a microinjeção de ácido dihidrokainico (DHK), um inibidor seletivo da captação de glutamato em astrócitos, na amígdala basolateral induziu efeito ansiogênico em ratos no teste de interação social, efeito esse revertido pela co-administração de AP5, um antagonista dos receptores do tipo NMDA (Lee et al, 2007). Assim, um aumento na oferta de glutamato na amígdala, decorrente de um prejuízo de captação de glutamato em astrócitos, pode induzir respostas do tipo ansiogênica e esquiva social em ratos (Lee et al, 2007).

Embora o hipocampo seja considerado uma estrutura tradicionalmente envolvida em processos relacionados à memória, recentemente tem aumentado o interesse nessa região no contexto da memória emocional. Tem sido demonstrado na literatura que o hipocampo ventral é importante para a emocionalidade, enquanto que o hipocampo dorsal é importante em processos de aprendizagem espacial (Barkus et al, 2010). De fato, tem sido demonstrado na literatura prejuízo de aprendizagem emocional (congelamento condicionado) em ratos com lesões no hipocampo ventral, mas não hipocampo dorsal (Bannerman et al, 2003; Maren, 1999; Maren et al, 1997; Richmond et al, 1999). O presente estudo concorda com estes dados, mostrando que uma redução da captação de glutamato no hipocampo ventral pode sustentar elevados níveis de ansiedade em ratos submetidos ao LCE.

Além de sua participação na modulação da ansiedade e memória emocional, um estudo prévio na literatura demonstrou que a captação hipocampal de glutamato também pode estar alterada em um modelo animal de depressão, o desamparo aprendido (Learned Helplessness; Almeida et al, 2010). Esse estudo relacionou o comportamento depressivo com a captação de glutamato em fatias de três estruturas cerebrais: córtex, estriado e hipocampo, sendo verificadas diferenças na captação glutamatérgica entre os grupos de ratos LH (Learned Helplessness) e NLH (Non—Learned Helplessness), especialmente no hipocampo. Os resultados mostraram que a captação de glutamato estava elevada no hipocampo imediatamente após o teste do LH, mas significativamente diminuída 24h e 21 dias após a indução do LH.

Em outro estudo, a administração central de um inibidor da captação de glutamato induziu sinais de anedonia e prejuízo de memória espacial nos animais, sugerindo que alterações na captação de glutamato pode representar um componente importante nos circuitos neurais envolvidos com anedonia e prejuízo cognitivo (Bechtholt-Gompf et al, 2010). Portanto, considerando os dados da literatura envolvendo testes pré-clínicos de distúrbios de humor, podemos sugerir que alterações na captação de glutamato podem gerar um ambiente sináptico apropriado para a ocorrência de transtornos psiquiátricos, tais como ansiedade e depressão.

O presente estudo também demonstrou que ratos do grupo CTBA, quando definidos pela %TBA inferior a 20%, exibem padrão característico de animais de elevada ansiedade. Por exemplo, está bem estabelecido na literatura que parâmetros comportamentais como a %TBA, %EBA e EBA são representativos, e se relacionam de forma

inversamente proporcional ao nível de ansiedade dos animais no labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987; WALL e MEISSER, 2000; RODGERS e JOHNSON, 1995), enquanto que o número de entradas nos braços fechados é uma variável representativa da atividade motora do animal (FILE & BRILEY, 1991; FILE, 1992).

O presente estudo indicou que a %TBA, %EBA e EBA foram significativamente inferiores àquelas apresentadas pelo grupo LTBA. Durante a exploração do LCE, os animais do grupo CTBA entraram menos nos braços abertos e permaneceram lá por um tempo menor em relação aos animais do grupo LTBA. Essa baixa exploração dos braços abertos não está relacionada a alguma diminuição na atividade motora dos animais, visto que o número de entradas nos braços fechados do labirinto não foi diferente entre os grupos CTBA e LTBA. Assim, corroborando a literatura, nossos resultados demonstraram que a menor exploração dos braços abertos do labirinto são decorrentes da preferência dos animais em explorar regiões do LCE com menores características ansiogênicas, tais como os braços protegidos por paredes laterais, evitando explorar aquelas com maiores características aversivas, ou seja, os braços abertos (Pellow et al., 1985).

Outro comportamento exploratório avaliado durante a exposição dos animais no LCE foi a avaliação de risco. Embora dados na literatura apontem que esse comportamento também é representativo e se comporta de forma diretamente proporcional ao nível de ansiedade (GRIEBEL et al., 1997), nosso estudo não indicou diferenças significativas no comportamento de avaliação de risco para os grupos CTBA e LTBA.

Embora o presente estudo tenha demonstrado um padrão exploratório distinto entre os grupos CTBA e LTBA no LCE, não observamos diferenças significativas na captação de glutamato do hipocampo ventral esquerdo e hipocampo ventral direito de animais do grupo CTBA e do grupo LTBA. Além disso, não foi observado diferença estatística significativa na captação de glutamato entre o hipocampo ventral esquerdo dos grupos CTBA e LTBA e entre o hipocampo ventral direito dos grupos CTBA e LTBA. Nosso estudo também não indicou a existência de correlação entre as variáveis %TBA, %EBA e AV. RISCO em relação à captação de glutamato. A princípio, os resultados sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica não poderia explicar a diferença no nível de ansiedade entre os grupos CTBA e LTBA. Entretanto outros aspectos devem ser levados em consideração antes da exclusão do glutamato. Por exemplo, é possível que a liberação de glutamato, e não a captação seja o processo alterado

nas sinapses glutamatérgicas no hipocampo ventral dos animais. Ademais, também é possível que a participação do glutamato em outra(s) região (ões), que não o hipocampo, possa explicar a diferença de exploração do LCE entre os grupos CTBA e LTBA. Por outro lado, outros sistemas neuroquímicos também podem estar envolvidos no padrão comportamental distinto entre os grupos CTBA e LTBA no LCE. O presente estudo não nos permite responder tais questionamentos, e futuros estudos poderão elucidar com maior clareza os mecanismos e substratos neurais envolvidos no estabelecimento dos níveis de ansiedade nos grupos CTBA e LTBA, bem como nos processos de aprendizagem emocional no LCE.

7 CONCLUSÕES

- 1- A captação de glutamato está reduzida no hipocampo ventral direito de ratos 24 horas após a sua exposição ao labirinto em cruz elevado.
- 2- A redução na captação de glutamato é assimétrica, indicando o envolvimento do hipocampo ventral direito no controle da emocionalidade.
- 3- A captação de glutamato no hipocampo ventral não pode explicar a variabilidade individual entre os animais (CTBA e LTBA), no tocante ao nível de ansiedade.
- 4- Não existe correlação entre o comportamento de avaliação de risco, percentual de tempo de permanência no braço aberto e percentual de entradas nos braços abertos do labirinto com a captação de glutamato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRAV, I.; RICHTER-LEVIN G. Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J Neurosci* 2002;22(22):9912-21.

ALMEIDA, F.R.; THOMAZI, A.P.; GODINHO, G.F.; SAUTE, J.A.M.; WOFCHUK, S.T.; SOUZA, D.O.; GANZELLA, M. Effects of Depressive-Like Behavior of Rats on Brain Glutamate Uptake. *Neurochem Res* (2010) 35:1164–1171

ALMEIDA FILHO, N. *et al.* Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity – Methodological features and prevalence estimates. *Br J Psychiatry*, 171:524-9, 1997.

ANDRADE, L. *et al.* Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 37:316-25, 2002.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T. *et al.* Regional dissociation within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Behav. Rev* 2004; 28:273–83.

BARKUS, C.; MCHUGH, S.B.; SPRENGEL, R.; SEEBURG, P.H.; RAWLINS, J.N.B.; BANNERMAN, D.M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol.* 2010 January 10; 626(1): 49–56.

BARTANUSZ, V.; AUBRY, J.M.; PAGLIUSI, S.; JEZOVA, D.; BAFFI, J.; KISS, J.Z. Stress-induced changes in messenger RNA levels of N-methyl-D-aspartate and AMPA receptor subunits in selected regions of the rat hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience.* 1995 May; 66(2):247-52.

BELSHAM, B., 2001. Glutamate and its role in psychiatric illness. *Human Psychopharmacology* 16, 139– 146.

BERK, M., PLEIN, H., FERREIRA, D., 2001. Platelet glutamate receptor supersensitivity in major depressive disorder. *Clinical Neuropharmacology* 24, 129– 132.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, (1988) pp. 43-68.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. *An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety*. In N. McNaughton and G. Andrews (Eds.). *Anxiety*, University of Otago Press (1990) pp. 124-133.

CARLSSON, A., HANSSON, L.O., WATERS, N., CARLSSON, M.L., 1999. A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry* 174, 2 –6.

CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001; Dec;25(7-8):697-709.

CHARLES, F. G.; KERRY, J. R. Emotional Learning and Glutamate: Translational Perspectives. *CME Rev* 2005; Aug 22;840-841.

CHARNEY, D.S.; DEUTCH, A. A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Crit Rev Neurobiol.* 1996;10(3-4):419-46.

CHENARD, B.L.; MENNITI, F.S. Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Des.* 1999;5:381-404.

CONDE CA, TOMAZ C, BOTELHO S. Papel de la amígdala en la ponderación de la severidad del estímulo aversivo: su relación con la memoria emocional en modelos comportamentales. *Salud UIS*, 33 (2001) pp.245-259.

CORTESE, B.M.; PHAM, K.L. The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr.* 2005 ct;10(10):820-30

CRUZ APM, FREI F, GRAEFF FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1994) pp.171-176.

DANBOLT, N.C. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105.

DANBOLT NC, ATTWELL D, BERGLES D, DEHNES Y, FURNESS D, GUNDERSEN V, HAMANN M, HOLMSETH S, QURESHI A, ROSSI D, ULLENSVANG K. 2006. Glutamate transporters around synapses. *J Neurochem* 96(Suppl. 87):100.

DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

GEGELASHVILI, G., SCHOUSBOE, A., 1997. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* 52, 6–15.

Gillespie C.F.; Ressler K.J. Emotional Learning and Glutamate: Translational Perspectives. Mount Sinai School of Medicine. Review Date: August 22, 2005.

GREENBERG, P.E. ; SISITSKY, T. ; KESSLER, R.C. ; et al. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. *J Clin Psychiatry.* 1999; 60:427-435.

DUNN, R.W.; CORBETT, R.; FIELDING, S. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. *Eur J Pharmacol.* 1989 Oct 4;169(1):1-10.

DUVOISIN, R.M.; ZHANG, C. ; PFANKUCH, T.F.; O'CONNOR, H.; GAYET-PRIMO, J.; QURASHI, S.; RABER, J. Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. *Eur J Neurosci.* 2005 Jul;22(2):425-36.

FENDT, M. (2001) Injections of the NMDA receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdale block the expression of fear-potentiated startle and freezing. *J. Neurosci.*, 21, 4111±4115.

FERNANDES C; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol, Biochem Behav* 1996;54:31–40.

FILE, S.E.; BRILEY. (1991). *New Concepts in Anxiety*. Londres. Macmillan Press.

FILE, S. E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. In J. M. Elliott, D. J. Heal, & C. A. Marsden (Orgs.), *Experimental approaches to anxiety and depression* (pp. 25-44). Nova York: Wiley.

FITZGERALD, L.W.; ORTIZ, J.; HAMEDANI, A.G.; NESTLER, E.J.; Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci*. 1996 Jan;16(1):274-82.

FRIZZO, M. E. S.; LARA, D. R; PROKOPIUK, A. S.; VARGAS, C. R.; SALBEGO, C. Z.; WAJNER, M.; SOUZA, D. O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol*. 22: 353-363, 2002.

GIMÉNEZ, L.L.; FERNÁNDEZ, T.A.; ESCORIHUELA, R.M.; FREDHOLM, B.B.; TOBEÑA, A.; PEKNY, M.; JOHANSSON, B. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci*. 2002 Aug;16(3):547-50

GRAY, J.A. The neuropsychological basis of anxiety. In: G.C. Last & m. Herson (Edts), *Handbook of anxiety disorder*. New York: Pergamon, 1988.

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

HO Y-J, EICHENDORFF J, SCHWARTING RKW. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. *Behav Brain Res* 2002;136:1–12.

ISAAC, J.T.; CRAIR, M.C.; NICOLL, R.A.; MALENKA, R.C. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron*. 1997;18:269-280.

IZARD, C.E. Basic emotions, relations among emotions, and emotion-cognition relations. *Psychol Rev.* 1992;99:561-565.

KANAI, Y.; HEDIGER, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447, 469–479.

KARCZ-KUBICHA, M.; JESSA, M.; NAZAR, M.; PLAZNIK, A.; HARTMANN, S.; PARSONS, C.G.; DANYSZ, W. bAnxiolytic activity of glycine-B antagonists and partial agonists--no relation to intrinsic activity in the patch clamp. *Neuropharmacology.* 1997 Oct;36(10):1355-67.

KEW, J.N; KEMP, J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 179:4–29.

KIM JJ, LEE HJ, HAN JS, PACKARD MG. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci* 2001;21(14):5222-8.

LEDGERWOOD, L.; RICHARDSON, R.; CRANNEY, J. Effects of D-cycloserine on extinction of conditioned freezing. *Behav Neurosci.* 2003;117:341-349.

LEDOUX J. In search of an emotional system in the brain: Leaping from fear to emotion and consciousness. In: *The Cognitive Neuroscience.* Gazzaniga, M.S. (Ed). (1995) MIT Press, Cambridge, Massachusetts London England. Cap 69, pp 1049-1061.

LEHRE KP, LEVY LM, OTTERSEN OP, STORM-MATHISEN J, DANBOLT NC. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: Quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835–1853.

LIPTON, S.A., ROSENBERG, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine* 330, 613– 622.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92 180-85 (1987).

LOPEZ, A.D.; MURRAY, C.C. - The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med.* 4(11):1241-3, 1998.

MCCULLUMSMITH, R.E., MEADOR-WOODRUFF, J.H., 2002. Striatal excitatory amino acid transporter transcript expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 26, 368– 375.

MCGAUH, J.L. Memory – a century of consolidation. *Sciences Compass*, 28: 248-251, 2000.

MCGAUGH JL. Memory-a century of consolidation. *Neuroscience* 2000; 287:248-51.

MCKERNAN, M.G.; SHINNICK-GALLAGHER, P. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature.* 1997;390:607-611.

MENARD J, TREIT D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:591–613.

MOGHADDAM, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 1993 May; 60(5):1650-7.

MOGHADDAM, B.; BOLINAO, M.L.; STEIN-BEHRENS, B.; SAPOLSKY, R. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* 1994 Aug 29;655(1-2):251-4.

MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J., SOUZA, D.O., TASCA, C.I., 2005. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem. Res.* 30 (1), 83–89.

OTTONI, E.B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers.* 32: 446-9, 2000.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system, *Prog. Neurobiol.* 54 (1998) 581–618.

PAWLAK CR, HO Y-J, SCHWARTING RKW, BAUHOFER A. Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behavior in the rat. *Neurosci Lett* 2003;341:205–8.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149– 67.

PEREIRA, L.O. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Brain Res.* 2004 Oct 1; 159:55-61.

PRZEGALIŃSKI, E.; TATARCZYŃKA, E.; DEREŃ-WESOLEK, A.; CHIINACKA-WÓJCIK, E. Anticonflict effects of a competitive NMDA receptor antagonist and a partial agonist at strychnine-insensitive glycine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1996, 54, 73–77. Abstract Book, 2002, 397.

RAUCH SL, SHIN LM, SEGAL E, et al. Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. *Neuroreport.* 2003;14:913-916.

RODGERS, R. J. AND COLE, J. C. Ethology and Psychopharmacology. S.J. Cooper and C.A. Hendrie Editor, 1994.

Rodgers, R. J; Johnson, N.J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1995; 52: 297-303.

RODGERS RJ, COLE JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA, editors. *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley, 1994. pp. 9 – 44.

RODGERS, R. J. *ET AL.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 289-304, 1997.

RUMPEL, S.; LeDOUX, J.; ZADOR, A.; MALINOW, R. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science*. 2005;308:83-88.

SCHWARTING RKW, THIEL CM, MÜLLER C, HUSTON JP. Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *NeuroReport* 1998;9:1025-9.

SEINDENBECHER T, LAXMI R, STORK O, PAPE H. C. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 2003;301:846-50.

SINGEWALD, N.; ZHOU, G.Y.; SCHNEIDER, C. Release of excitatory and inhibitory amino acids from the locus coeruleus of conscious rats by cardiovascular stimuli and various forms of acute stress. *Brain Res*. 1995 Dec 15;704(1):42-50.

SINGEWALD, N.; ZHOU, G.Y.; CHEN, F.; PHILIPPU, A. Corticotropin-releasing factor modulates basal and stress-induced excitatory amino acid release in the locus coeruleus of conscious rats. *Neurosci Lett*. 1996 Feb 2;204(1-2):45-8.

SCHWARTZ, JAMES H.; JESSELL, THOMAS M.; KANDEL, ERIC R.: *Princípios Da Neurociência*. Barueri: Manole, 2003.

TEIXEIRA, K.V.; CAROBREZ, A.P. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci*. 1999 Feb; 113(1):196-203.

TOMAZ C, GIUGLIANO LG. A razão das emoções: um ensaio sobre "O erro de Descartes". *Estudos de Psicologia*, 2 (1997) pp 407-411.

TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol, Biochem Behav* 1993;44:463-9.

TROTTI, D., 2002. A role for glutamate transporters in neurodegenerative diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 513, 225-248.

YAMASUE H, KASAI K, IWANAMI A, et al. Voxel-based analysis of MRI reveals anterior cingulate gray-matter volume reduction in posttraumatic stress disorder due to terrorism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9039-9043.

WALL, P. M.; MEISSER, C. Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* 2000; 114: 199- 212.

WILSON, H. D.; BOYETTE-DAVIS, J.; FUCHS, P. N. The relationship between basal level of anxiety and the affective response to inflammation. *Physiology & Behavior* 2007; 506–511

