

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA MARIA ARAUJO DE SOUZA

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ÚNICA DE DOSES
INTERMEDIÁRIAS DE PILOCARPINA NOS COMPORTAMENTOS
RELACIONADOS COM ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS
SWISS

MACEIÓ

2018

FERNANDA MARIA ARAUJO DE SOUZA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ÚNICA DE DOSES
INTERMEDIÁRIAS DE PILOCARPINA NOS COMPORTAMENTOS
RELACIONADOS COM ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS
SWISS**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Duzzioni

MACEIÓ

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S731e Souza, Fernanda Maria Araujo de.
Efeitos da administração única de doses intermediárias de pilocarpina nos comportamentos relacionados com ansiedade e depressão em camundongos swiss / Fernanda Maria Araujo de Souza. – 2018.
98 f. : il.

Orientador: Daniel Leite Góes Gitai.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 84-9.
Anexos: f. 96-98.

1. Ansiedade. 2. Depressão. 3. Pilocarpina – Administração e dosagem.
I. Título.

CDU: 616.89-008.441



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Fernanda Maria Araujo de Souza

Efeitos da administração única de doses intermediárias de pilocarpina nos comportamentos relacionados com ansiedade e depressão em camundongos Swiss

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 01 de março de 2018.

Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Marcelo Duzzioni (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto – (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Leticia Anderson Bassi - (CESMAC)

*“Dedico aos meus pais que de tudo, nunca nada me faltou.
Ao contrário. Do amar e do amor, sempre tudo transbordou...”*

AGRADECIMENTOS

A Deus e todos os intermediários de lá de cima que sempre conversam comigo em nossas orações e acalmam meu coração. Por meio de nossas conversas, Ele reforça que sempre estará comigo em todos os momentos e que não há o que temer.

Aos meus pais que modestamente, são os melhores deste mundo. Desde sempre me ensinaram os valores mais importantes desta vida; o amar e o respeitar. Dedico todas as minhas conquistas a ambos porque eles sempre me deixaram ir atrás de quem eu “sonhava ser”. Sempre apoiaram todos os meus sonhos e me incentivaram de tal modo que a desistência cansou de lutar e optou por desistir. Amo vocês imensuravelmente!

A minha família, em especial, aos meus irmãos, Allan e Michael, e minhas cunhadas, Thai e Alycia, por sempre acreditarem e persistirem comigo também em minhas aventuras na vida.

Aos meus três sobrinhos lindos, Letícia, Pedro e Valentina, por muitas vezes que retornei dos experimentos, me proporcionarem o quanto um abraço pode ser infinito, revigorador e trazer tanto amor. Eles trazem pureza e a sensação que a vida é bem mais simples e colorida do que acreditamos que seja.

Ao meu namorado, noivo, amigo e companheiro da vida, Lucas. Agradeço por acreditar de forma indescritível em mim e por me apoiar em tudo. Agradeço por todas as noites estudando comigo apesar de atuar em uma área tão, mas tão distante da minha. Obrigada por sempre está disposto a ajudar e compartilhar comigo, todas as “teorias do universo”. Te amo!

As minhas amigas-irmã de infância, Cati e Nêu, por me abraçarem quando preciso de seus abraços, por me alegrarem quando preciso da alegria e por compartilhar anos e anos de amizade com todo o amor possível!

As minhas amigas-irmãs da graduação, Sarah e Mille. Sarinha, minha camarada, que mesmo tão distante fisicamente, está integralmente presente em minha vida. A distância parece que nem existe porque nos ajudamos em tudo o quanto é possível e inimaginável. Milloca, com quem aprendi e aprendo sempre, uma amiga estudiosa, esforçada e engraçada. Sempre disposta a ajudar!

As amigadas que fiz ao longo da minha graduação e me acompanham até hoje, mesmo que não sejam diários os nossos contatos. Em especial aos amigos: Jadi, Myka, Ana, Dan, Kelly, Fran, Jana e Jeff.

Agradeço a minha outra família, aos amigos do Behavior Lab: Nívea, Neto, Danny, Gaby, Dany 2, Ricardinho e Jardel. Obrigada por toda a ajuda sempre disponível. Obrigada por tornarem os experimentos alegres por mais que fossem cansativos e silenciosos. Obrigada por todas as horas de vídeos assistidas. Obrigada por tudo, de todo o meu coração! Agradeço em especial a jovem Nívea, que embora “não favorável” no “período matutino”, me agregou muitos aprendizados. Depois que

começamos a compartilhar a vida, os bolos e os doces, pudemos aprender uma com o jeitinho da outra.

Agradeço em especial ao Neto e a Danny, amigos de todos os dias, amigos dos perrengues experimentais mais graves, das risadas e eternos ensinamentos. Neto com seu jeitinho totalmente “autêntico” de ser me arrancava várias risadas e me fazia entender que às vezes temos que ser “egípcios” mesmo. Danny, com seu jeitinho totalmente “estou estressada Nanda” me ensinou bastante e me ensina, diariamente com sua disciplina, companheirismo e precisão. Todos os três totalmente diferentes, mas, muito bem complementares. Muito obrigada por tudo.

Agradeço ao pessoal dos ratinhos, Amandinha, Igor, Maysa, Cibele, Juci e Shirley; obrigada por todo incentivo sempre. Em especial, a Amandinha, um doce de ser humano. Agrega só flores e alegria ao coração da gente. Obrigada por seus abraços e um carinho sem fim! Ao Igor, um amiguinho de fé; o cabeça. Sempre disposto a ajudar e a conversar. Obrigada por todos os compartilhamentos!

Ao meu amiguinho que me acompanha desde o período da graduação, seu Galego. Com seu jeitinho engraçado e espontâneo de ser, me alegra todos os dias.

Ao laboratório de BCM por toda a disponibilidade de alguns aparatos para a realização deste trabalho. Em especial a Mykinha e a Bruninha; duas pessoas maravilhosas e amorosas. E, ao laboratório LAPEVI, em especial ao Prof. Ênio que sempre esteve disposto, com sua paciência e dedicação extremamente admiráveis, em ajudar na “saga da corticosterona”.

Aos professores que tive o privilégio de conhecer durante a minha graduação e pós-graduação, com os quais, pude compartilhar momentos de alegria e/ou conversas de extremo aprendizado: Profa Cláudia, Profa Janira, Prof. Olagide, Prof. Daniel, Prof. Marcos, Prof. João Vicente e Prof. Le Camphion. Ao Prof. Olagide que sempre mencionou desde tempos remotos que eu iria trabalhar em seu laboratório, sempre acreditou em mim e sempre esteve disposto a ajudar em tudo o que fosse possível mesmo com o tempo totalmente corrido. Por causa dele, consegui evoluir em diversos aspectos e aprendi a enxergar o mundo energeticamente diferente. Muito obrigada professor!

Por fim e desde o começo, ao meu orientador, Prof. Marcelo, minha eterna gratidão de coração. Sou totalmente grata por ele ter me recebido em seu laboratório de braços abertos, mesmo sem ter tido quaisquer experiências prévias na área de Neurofarmacologia. O professor Marcelo tem “um jeito” de fazer com que seus alunos sintam-se sempre capazes. Nunca importava o quanto me sentia preocupada com algo, após conversar com ele, sempre acreditava que “poderia” enfrentar qualquer desafio. Com uma serenidade e calma indescritível, semelhante aos budas orientais, sempre me convencia que no final “tudo iria dar certo” mesmo que, todo o universo estivesse conspirando contra. Muito obrigada professor. O senhor é **um exemplo** admirável de orientador, professor e ser humano. Chegamos hoje, a mais um “tudo vai dar certo”- se Deus quiser...

RESUMO

Os transtornos de ansiedade e depressão apresentam similaridade genética e neurobiológica e constituem grave problema de saúde pública. Estudos recentes sugerem a administração única de doses subconvulsivantes de pilocarpina (PILO) como um modelo animal para estudo da ansiedade. Entretanto, no desenvolvimento e padronização de modelos animais para estudar psicopatologias um critério importante envolve estabelecer a validade do modelo quanto à verdadeira representação dos processos que estão sendo estudados. O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos comportamentais a curto e longo prazo da administração única de doses intermediárias de PILO em camundongos *Swiss* machos e fêmeas submetidos a diferentes testes de ansiedade e de depressão. Para isso, camundongos *Swiss* machos e fêmeas adultos foram tratados com brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg, s.c.) e, após 30 minutos, com PILO (75, 150 e 350 mg/Kg, i.p.) ou Salina (NaCl 0,9%). Após o tratamento com PILO, os animais foram observados por 90 minutos para caracterização comportamental da intensidade das crises convulsivas, de acordo com a Escala de Racine (1972). Passadas 24h ou 30 dias do tratamento, os animais foram submetidos a diferentes testes de ansiedade [labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa claro-escuro (CCE)], locomoção [campo aberto (CA) e rota-rod (RR)] e de depressão [nado forçado (TNF)]. Também foi realizado o registro eletroencefalográfico (EEG) do córtex e hipocampo de camundongos fêmeas 24h após a administração de PILO. Nossos resultados demonstraram que todas as doses de PILO promoveram alterações na Escala de Racine, mas somente aqueles animais que apresentaram grau de intensidade menor ou igual a 3 (PILO 75 e 150 mg/Kg) foram submetidos aos testes comportamentais. No LCE, a administração de PILO 75 mg/Kg reduziu de maneira significativa a frequência de entradas (em machos) e a porcentagem de tempo (em fêmeas) nos braços abertos 24h após o tratamento, indicando um efeito do tipo ansiogênico. Essa mesma dose de PILO também reduziu o tempo gasto no compartimento claro (em fêmeas) da CCE, 30 dias após o tratamento, indicando um efeito do tipo ansiogênico a longo prazo. No TNF, a administração de PILO 75 mg/Kg diminuiu o tempo de imobilidade 24h após o tratamento (em machos e fêmeas) e aumentou 30 dias após (em fêmeas), indicando um efeito do tipo antidepressivo e depressivo respectivamente. Nenhuma alteração motora foi observada no CA e RR após a administração de PILO 75 mg/Kg, descartando qualquer interferência motora nos resultados encontrados, bem como nenhuma alteração no registro EEG cortical após 24h. O tratamento com PILO 150 mg/Kg não alterou nenhum dos parâmetros avaliados nos diferentes testes comportamentais. Nossos resultados encontrados nos testes de ansiedade corroboram e estendem dados prévios da literatura, que indicam a administração única de doses intermediárias/subconvulsivantes de PILO como um modelo de ansiedade. Os resultados no TNF demonstraram, pela primeira vez, um efeito do tipo antidepressivo de curta duração e um efeito do tipo depressivo de longa duração. Novos estudos são necessários para estender a validação deste modelo animal de ansiedade.

Palavras-chave: Ansiedade. Depressão. Pilocarpina.

ABSTRACT

Anxiety and depression disorders present genetic and neurobiological similarity, and both are a serious public health problem. Recent studies suggest the single administration of subconvulsant doses of pilocarpine (PILO) as animal model for the study of anxiety. However, an important criterion for developing animal models to study psychopathology involves establishing the validity of the model as a true representation of the processes being studied. Therefore, the present study aimed to evaluate the short- and long-term behavioral effects of a single administration of intermediate doses of PILO on the behavior of male and female *Swiss* mice submitted to different anxiety and depression tests. Animals were treated with scopolamine methylbromide (1 mg/Kg, s.c.) and, after 30 min, with PILO (75, 150 and 350 mg/Kg, i.p.) or Saline (NaCl 0,9%). Within 1.5h of the administration of PILO, the behavioral seizures were scored according to the Racine's scale. Twenty-four hours or 30 days after the last treatment, animals were submitted to different anxiety [elevated plus maze (EPM) and light-dark box (LDB)], locomotion [open field test (OFT) and rota-rod (RR)] and depression [forced swim test (FST)] tests. The cortical and hippocampal electroencephalography (EEG) activity of female mice 24h after the treatment with PILO was also recorded. Our results demonstrated that all doses of PILO display alterations in the Racine's scale. However, only the animals that had a stage less than 3 on the Racine's scale (PILO 75 and 150 mg/Kg) were submitted to behavioral tests. The administration of PILO 75 mg/Kg reduced the frequency of entries (male) and the percentage of time (female) in the open arms of EPM, 24h after the treatment, indicating an anxiogenic-like effect. In LDB, PILO 75 also reduced the time spent in the light compartment (female) 30 days after treatment, indicating an anxiogenic-like effect too. In FST, administration of PILO 75 mg/Kg decreased the immobility time 24 h (male and female) and increased 30 days (female) after the treatment, indicating an antidepressant and depressive-like effects respectively. In contrast, the same dose increased the immobility time 30 days after the treatment, indicating a depressive-like behavior. No motor change was found in the OF and RR tests after administration of PILO 75 mg/Kg, as well as no alterations in the cortical EEG record after 24h. Treatment with PILO 150 mg/kg no changed any of the parameters in the different behavioral tests. Further studies are necessary to extend the validation of this animal model of anxiety, such as predictive validity. Our results found in the anxiety tests corroborate and extend previous literature data, which indicate the single administration of subconvulsant doses of PILO as an anxiety model. For the first time, TNF results demonstrated a short antidepressant-like and a long depressive-like effects. Further studies needed necessary to extend the validation of this animal model of anxiety

Keywords: Anxiety. Depression. Pilocarpine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Rota-rod (RR). Aparato utilizado para avaliar a atividade locomotora forçada nos camundongos <i>Swiss</i>	50
Figura 2-	Campo aberto (CA). Aparato utilizado para avaliar a atividade locomotora espontânea nos camundongos <i>Swiss</i>	51
Figura 3-	Labirinto em cruz elevado (LCE). Aparato utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com medo e ansiedade nos camundongos <i>Swiss</i>	51
Figura 4-	Caixa claro-escuro (CCE). Aparato utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com medo e ansiedade nos camundongos <i>Swiss</i>	52
Figura 5-	Teste do nado forçado (TNF). Aparato utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com depressão nos camundongos <i>Swiss</i>	53
Figura 6-	Delineamento experimental realizado para avaliação comportamental dos camundongos <i>Swiss</i> de acordo com a Escala de Racine.	53
Figura 7-	Delineamento experimental para a avaliação da atividade eletroencefalográfica (EEG) dos animais tratados com Pilocarpina.	54
Figura 8-	Delineamento experimental para avaliação dos animais nos testes de ansiedade e locomoção 24 horas ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina.	55
Figura 9-	Delineamento experimental para avaliação dos animais nos testes de locomoção e depressão 24 horas ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina.	56
Figura 10-	Fotomicrografias de esfregaço vaginal de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas na fase diestro do ciclo estral tratados com Pilocarpina (PILO; 75 ou 150 mg/Kg, i.p.).	59
Figura 11-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 350 mg/Kg, i.p.) na atividade elétrica do córtex de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	59
Figura 12-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	60
Figura 13-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	61
Figura 14-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	62

Figura 15-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	63
Figura 16-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	64
Figura 17-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	64
Figura 18-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste da caixa claro-escuro (CCE), em camundongos <i>Swiss</i> machos.	65
Figura 19-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	66
Figura 20-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste do campo aberto (CA).	67
Figura 21-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste do campo aberto (CA).	67
Figura 22-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	69
Figura 23-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	70
Figura 24-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	70
Figura 25-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V, 2013).	24
Quadro 2-	Revisão dos principais testes animais empregados para avaliação dos transtornos de ansiedade em laboratório.	26
Quadro 3-	Classificação dos transtornos depressivos de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V, 2013).	33
Quadro 4-	Revisão dos principais testes animais empregados para avaliação dos transtornos depressivos em laboratório.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Análise comportamental realizada por meio da Escala de Racine dos camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas tratados com Pilocarpina (PILO; 75 ou 150 mg/Kg, i.p.).	58
Tabela 2-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	60
Tabela 3-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	61
Tabela 4-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	62
Tabela 5-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	63
Tabela 6-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos <i>Swiss</i> machos.	64
Tabela 7-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	65
Tabela 8-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE), em camundongos <i>Swiss</i> machos.	65
Tabela 9-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE), em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.	66
Tabela 10-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento no teste Rota-rod.	68
Tabela 11-	Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento no teste Rota-rod.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMG	Amígdala
AMPe	Monofosfato cíclico de adenosina
BLA	Amígdala basolateral
BZDs	Benzodiazepínicos
CA	Teste do campo aberto
CCE	Teste da caixa claro-escuro
CPF	Córtex pré-frontal
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CRF	Fator de liberação de corticosterona
CRUZ	Cruzamentos totais no compartimento claro
DA	Dopamina
DAP	Diacilglicerol
DM	Transtorno depressivo maior
DSM-V	Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais
EBA	Entrada nos braços abertos
EBF	Entrada nos braços fechados
EEG	Registro eletroencefalográfico
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GAD	Ansiedade Generalizada
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPCv	Hipocampo ventral
LCE	Labirinto em cruz elevado
LECE	Latência para entrar no compartimento escuro
mAChRs	Receptores colinérgicos muscarínicos
MAOI	Inibidores da enzima monoaminoxidase
nAChRs	Receptores colinérgicos nicotínicos
nECE	Número de entradas no compartimento escuro
NLST	Núcleo leito da estria terminal
PILO	Pilocarpina

PMd	Núcleo pré-mamilonar dorsal
pSAP	Stretched attend posture protegido
REA	Rearing
RR	Teste do Rota-rod
SAP	Stretched attend posture
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNRIs	Inibidores seletivos da receptação de
TBA	Tempo nos braços abertos
TCC	Tempo no compartimento claro
TNF	Teste do nado forçado
uHD	Head-dipping não protegido ou mergulho de cabeça não protegido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO	22
2.1 Transtornos de ansiedade	23
2.1.1 Modelos animais de ansiedade	24
2.1.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)	28
2.1.3 Caixa claro-escuro (CCE)	29
2.1.4 Campo aberto (CA)	29
2.1.5 Um novo modelo animal de ansiedade: doses subconvulsivantes de pilocarpina – um agonista não seletivo de receptores muscarínicos da acetilcolina (ACh).....	30
2.2 Transtornos de depressão	32
2.2.1 Modelos animais de depressão	33
2.2.2 Teste do nado forçado (TNF)	35
2.2.3 Doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de pilocarpina – um novo modelo animal de depressão?	36
3 EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO ...	37
4 TRATAMENTO PARA OS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO	40
4.1 Tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade	41
4.2 Tratamento farmacológico dos transtornos de depressão	43
5 OBJETIVOS	45
5.1 Geral	46
5.2 Objetivos	46
6 MATERIAS E MÉTODOS	47
6.1 Animais	48
6.2 Drogas e soluções	48
6.3 Escala de Racine	48
6.4 Determinação do ciclo estral	48
6.5 Cirurgia estereotáxica para implante dos eletrodos	49
6.6 Registro da atividade elétrica cortical e hipocampal	49
6.7 Testes comportamentais utilizados	49
6.7.1 Rota-rod (RR)	50
6.7.2 Teste do campo aberto (CA)	50
6.7.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	51
6.7.4 Caixa claro-escuro (CCE)	51

6.7.5 Teste do nado forçado (TNF)	52
6.8 Delineamento experimental	53
6.8.1 Experimento 1. Determinar as doses intermediárias de pilocarpina por meio da caracterização comportamental proposta na Escala de Racine (1972) quanto a gravidade.....	53
6.8.2 Experimento 2. Avaliar a atividade elétrica no córtex e hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas 24h após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina	54
6.8.3 Experimento 3. Avaliação comportamental 24 horas e 30 dias após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina em camundongos machos e fêmeas submetidos a diferentes testes de ansiedade e locomoção	54
6.8.4 Experimento 4. Avaliação comportamental 24 horas e 30 dias após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina em camundongos machos e fêmeas submetidos ao teste do nado forçado (teste de depressão)	55
6.9 Processamento de dados e análises estatísticas	56
7 RESULTADOS	57
7.1 Escala de Racine	58
7.2 Ciclo estral	58
7.3 Registros eletroencefalográficos (EEG)	59
7.4 Testes de ansiedade	60
7.4.1 Labirinto em cruz elevado (LCE) – 24 horas	60
7.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE) – 30 dias	61
7.4.3 Caixa claro-escuro (CCE) – 24 horas	63
7.4.4 Caixa claro-escuro (CCE) – 30 dias	65
7.5 Teste de locomoção	66
7.5.1 Teste do campo aberto (CA) – 24 horas	66
7.5.2 Teste do campo aberto (CA) – 30 dias	67
7.5.3 Rota-rod (RR) – 24 horas	68
7.5.4 Rota-rod (RR) – 30 dias	68
7.6 Teste de depressão	68
7.6.1 Teste do nado forçado (TNF) – 24 horas	68
7.6.2 Teste do nado forçado (TNF) – 30 dias	70
8 DISCUSSÃO	72
8.1 Ansiedade	73
8.2 Depressão	78

9 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	84
ANEXOS	96

Diferentes estudos sugerem uma similaridade genética e neurobiológica entre transtornos depressivos e transtornos de ansiedade. Pacientes com transtornos de ansiedade, como os de ansiedade generalizada (GAD) e pânico, são frequentemente diagnosticados com transtornos depressivos (GORMAN, 1996; MONTGOMERY e JUDGE, 2000). Embora exista uma variedade de tratamentos farmacológicos para esses transtornos mentais, os resultados clínicos estão longe dos ideais (DUMAN, 2010).

Vários neurotransmissores têm sido implicados na ansiedade. Entre eles figuram as aminas biogênicas, como a noradrenalina (DELL'OSSO et al., 2010), a serotonina (GRAEFF, 2002) e a dopamina (DA; ZARRINDAST et al., 2011), os aminoácidos, como o ácido gama-aminobutírico (GABA; TRINCAVELLI et al., 2012) e o glutamato (HARVEY e SHADHID, 2012), os neuropeptídeos, como o fator de liberação da corticotrofina (CRF, do inglês *corticotropin releasing factor*; ROTZINGER et al., 2010) e a acetilcolina (GRAY e MacNAUGHTON, 2000). Entretanto, o papel de alguns neurotransmissores, *e.g.*, a acetilcolina (ACh), têm recebido relativamente pouca atenção.

Recentemente, Duarte et al. (2010; 2013) demonstraram que a administração única de uma dose subconvulsivante (intermediária) de pilocarpina (PILO; 150 mg/Kg, i.p.; agonista não seletivo de receptores muscarínicos da acetilcolina) produz um efeito do tipo ansiogênico de longa duração, em ratos, quando avaliados em diferentes testes de ansiedade; bem como um aumento, 1 mês após a injeção, no ritmo teta hipocampal. Esses resultados somados aos da literatura envolvendo o sistema colinérgico nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade levaram Duarte et al. (2010; 2013) a sugerir a administração de doses subconvulsivantes de PILO como um teste de traço de ansiedade.

Entretanto, um critério importante no desenvolvimento de modelos animais para estudar psicopatologias envolve estabelecer a validade do modelo quanto à verdadeira representação dos processos que estão sendo estudados. De maneira ideal, um modelo animal deve possuir validade preditiva e teórica (ou validade de constructo teórico) para que possa ser utilizado para identificar promissores tratamentos e entender os mecanismos e a etiologia dos transtornos mentais (MCKINNEY, BUNNEY, 1969; WILLNER, 1984). E nesse processo de validação, a utilização de diferentes espécies animais contribui para a validação pré-clínica de um modelo, além de selecionar a espécie animal mais apropriada.

Assim, o presente estudo teve por objetivo validar a administração única de doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de PILO como um modelo de ansiedade traço em roedores ao corroborar e estender resultados prévios da literatura obtidos com ratos Wistar

machos para camundongos *Swiss* de ambos os gêneros. Além disso, caracterizar os efeitos desse tratamento nos comportamentos relacionados com depressão em camundongos.

2 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

2.1 Transtornos de ansiedade

O termo “ansiedade” deriva do grego “*agkhô*” que significa estrangular, sufocar ou oprimir. Deste termo, surgiu na língua latina o prefixo “*anxio*” que também, relaciona-se a definições semelhantes de apertar ou constringir (PICHOT, 1996 *apud* VIANA, 2010). A ansiedade é considerada uma emoção semelhante ao medo apesar de existirem diferenças, *e.g.*, quanto à fonte de perigo. De fato, no medo a origem da ameaça é definida, enquanto na ansiedade é incerta ou desconhecida (GRAEFF, 1999).

A ansiedade e o medo produzem mudanças fisiológicas, *e.g.*, o aumento da frequência e dos batimentos cardíacos, tremores, sudorese, falta de ar e o aumento da motilidade intestinal (GRAEFF, 1999). Em níveis normais, a ansiedade possui valor adaptativo, uma vez que pode funcionar como uma reação ao estado de perigo ou detectar de forma antecipada novas ocorrências neste mesmo estado. Dessa forma, podem-se evitar danos físicos ou prejuízos psicológicos ao organismo. Em contrapartida, em níveis elevados a ansiedade prejudica o desempenho cognitivo, intelectual e neuropsicológico do organismo (PADILLA-COREANO et al., 2016; VIANA, 2010).

De acordo com a 5ª edição do Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM-V, do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), da Associação Americana de Psiquiatria (APA, *American Psychiatric Association*; 2013), a ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes tipos, conforme pode ser observado no Quadro 1, a seguir. Embora a sintomatologia muitas vezes possa ser enquadrada em mais de um transtorno, a categorização dos transtornos de ansiedade é de grande utilidade na escolha do tratamento farmacológico (APA, 2013). E diferente da versão anterior, na DSM-V o transtorno de estresse pós-traumático e o transtorno obsessivo compulsivo foram classificados separadamente dos transtornos de ansiedade.

A ansiedade também pode ser classificada em ansiedade-estado e ansiedade-traço. A ansiedade-estado refere-se a um estado emocional transitório, caracterizado por sentimentos subjetivos de tensão que podem variar em intensidade ao longo do tempo, enquanto a ansiedade-traço refere-se a uma disposição pessoal, relativamente estável, a responder com ansiedade a situações estressantes e uma tendência a perceber um maior número de situações como ameaçadoras (SPIELBERGER, 1972; SYLVERS et al., 2011).

Quadro 1. Classificação dos transtornos de ansiedade de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V.

Transtorno	Principais características
Transtorno de ansiedade de separação	Medo ou ansiedade excessivos envolvendo a separação de casa ou de figuras de apego.
Mutismo seletivo	Fracasso consistente para falar em situações sociais nas quais existe expectativa para que se fale, mesmo que o indivíduo fale em outras situações.
Fobia específica	Medo ou ansiedade acentuado a presença de um objeto ou situação em particular (<i>e.g.</i> , voar, alturas e animais).
Transtornos de ansiedade social (fobia social)	Medo ou ansiedade acentuado/intenso acerca de situações sociais em que o indivíduo é exposto a possível avaliação por outras pessoas.
Transtorno de pânico	Ataques abruptos de medo intenso ou desconforto intenso (ataques de pânico) recorrente e inesperado, gerando preocupação persistente.
Agorafobia	Medo e esquiva de lugares ou situações em que a fuga é difícil ou embaraçosa, ou onde pode ser difícil conseguir ajuda (<i>e.g.</i> , elevador).
Transtorno de ansiedade generalizada	Ansiedade e preocupação excessivas, ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses, com diversos eventos ou atividades.
Transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento	Ansiedade devido a intoxicação ou abstinência de substância (<i>e.g.</i> , cocaína) ou a um tratamento medicamentoso.
Transtornos de ansiedade devido a outra condição médica	Sintomas de ansiedade são consequência fisiológica de outra condição médica (<i>e.g.</i> , hipertireoidismo, asma e neoplasias).
Outro transtorno de ansiedade especificado	Sintomas não satisfazem todos os critérios para qualquer transtorno de ansiedade específico (<i>e.g.</i> , ansiedade generalizada não ocorrendo na maioria dos dias).
Transtorno de ansiedade não especificado	Sintomas não satisfazem os critérios para qualquer transtorno na classe diagnóstica dos transtornos de ansiedade.

Fonte: DSM-V, 2013.

2.1.1 Modelos animais de ansiedade

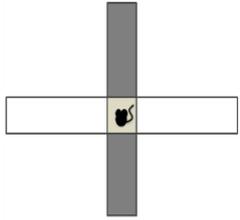
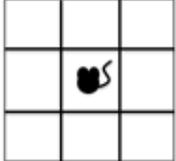
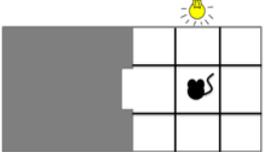
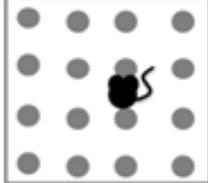
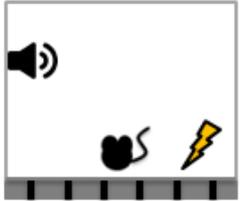
O início dos experimentos pré-clínicos com modelos animais para investigar os mecanismos neurais envolvidos na ansiedade patológica humana teve fundamento a partir da perspectiva evolutiva proposta por Charles Darwin em seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais”. Darwin observou, em animais, que as manifestações emocionais se

originavam em movimentos indicativos de disposições comportamentais e que estas, por sua vez, tinham valor adaptativo (GRAEFF, 1999). As observações propostas por Darwin foram de extrema importância para a fundamentação da disciplina Etiologia e da mesma forma, na associação dos experimentos de laboratório com a observação sistemática do comportamento (GRAEFF, 1999).

Segundo McKinney, Bunney (1969) e Willner (1984), a validade dos modelos animais para os transtornos mentais devem assumir três critérios básicos: a validade de face (até que ponto o fenótipo do animal reproduz a condição humana), a validade preditiva (até que ponto a extensão dos agentes farmacológicos que reduzem a ansiedade em modelos animais também reduzem em humanos) e a validade construtiva (extensão em que as causas subjacentes da condição humana e do fenótipo animal são equivalentes). Os modelos e os testes de ansiedade são meios distintos de exposição dos animais. Enquanto os testes expõem o animal a uma situação para evocar uma ansiedade aguda, os modelos, por sua vez, manipulam os animais para que produzam uma ansiedade mais duradoura ou permanente (GRIEBEL; HOMES, 2013).

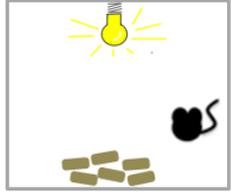
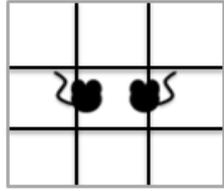
A premissa básica dos modelos animais para avaliar a ansiedade é reproduzir uma situação ambiental de provável ocorrência de diferentes formas de aversão ou desconforto, *e.g.*, ambientes novos ou potencialmente perigosos. Os padrões comportamentais e as reações fisiológicas associadas a estas situações de perigo são utilizados como medidas correspondentes à ansiedade em humanos (CAMPOS et al., 2013). A seguir, uma revisão dos principais testes animais de ansiedade (Quadro 2). A maioria destes testes animais mostra-se sensível aos benzodiazepínicos (BZDs) – classe farmacológica amplamente utilizada no tratamento dos transtornos de ansiedade (GRIEBEL; HOLMES, 2013).

Quadro 2. Revisão dos principais testes animais empregados para avaliação dos transtornos de ansiedade em laboratório. (Continuação)

Princípio do teste	Teste e breve descrição	Ilustração
<p>Baseia-se na aversão inata do animal em explorar ambientes novos, abertos e/ou iluminados. Para o animal, estas áreas são mais vulneráveis a ameaças ambientais.</p>	<p><u>Labirinto em cruz elevado (LCE)</u> O animal ansioso se esquiva dos braços abertos e permanece mais tempo nos braços fechados, protegidos por paredes (HANDLEY; MITHANI, 1984).</p>	
	<p><u>Labirinto em zero ou elevado zero maze</u> Semelhante ao LCE, o animal ansioso permanece mais tempo no compartimento fechado (SHEPHERD et al., 1994).</p>	
	<p><u>Campo aberto</u> O animal ansioso permanece mais tempo na periferia do aparato, comportamento denominado tigmotaxia (HALL, 1934).</p>	
	<p><u>Caixa claro-escuro</u> O animal ansioso permanece por mais tempo no compartimento escuro do aparato (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).</p>	
	<p><u>Escadarias</u> O animal ansioso tende a se elevar sobre as duas patas (rearing) e subir menos degraus (SIMIAND et al., 1984).</p>	
	<p><u>Holeboard test</u> O animal ansioso explora menos os buracos, ou seja, tem menos mergulhos de cabeça (FILE; WARDILL, 1975).</p>	
<p>Baseia-se no comportamento do animal frente a estímulos condicionados (e.g., auditivo) associados a choques elétricos.</p>	<p><u>Medo condicionado</u> O animal ansioso quando exposto ao estímulo condicionado, permanece imóvel, em congelamento (LORENZINI et al., 1984).</p>	

Fonte: Autora, 2017.

Quadro 2. Revisão dos principais testes animais empregados para avaliação dos transtornos de ansiedade em laboratório. (Conclusão)

Princípio do teste	Teste e breve descrição	Ilustração
Baseia-se na supressão da alimentação em consequência da aversão ao ambiente novo em que o animal é exposto.	<p><u>Hiponeofagia</u></p> <p>Se a comida estiver em um ambiente novo e intensamente iluminado, o animal ansioso leva mais tempo para se aproximar da comida e, conseqüentemente, se alimenta menos (MERALI et al., 2003).</p>	
Baseia-se na detecção da vocalização ultrassônica de animais. A frequência da vocalização varia de acordo com o estado emocional do animal.	<p><u>Vocalização ultrassônica</u></p> <p>O animal ansioso emite uma maior frequência de emissões de vocalização, <i>e.g.</i>, quando os animais, ainda filhotes, são separados da mãe (GARDNER, 1985).</p>	
Baseia-se no comportamento do animal quando em contato com outro animal desconhecido.	<p><u>Interação social</u></p> <p>A diminuição da interação social indica um comportamento tipo ansioso do animal (FILE, 1985).</p>	

Fonte: Autora, 2017.

Dentre os testes animais de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE), a caixa claro-escuro (CCE) e o campo aberto (CA) têm sido utilizados em aproximadamente 4000 experimentos para a investigação de fármacos com potencial efeito do tipo ansiolítico. Entre os anos de 1960 a 2002, o LCE e a CCE foram utilizados em cerca de 2.500 e 840 ensaios, respectivamente, constituindo os testes mais populares atualmente (GRIEBEL; HOLMES, 2013). Embora, as medições para os níveis de ansiedade possam ser feitas utilizando-se um único teste, grande parte das pesquisas científicas fazem utilização de uma bateria destes, uma vez que, diferentes testes medem a ansiedade em diferentes condições (VAN GAALEN; STECKLER, 2000).

Apesar dos modelos animais para estudo da ansiedade serem bem validados e terem explorado diferentes aspectos importantes da ansiedade, a ausência do conhecimento na complexidade dos substratos neurais envolvidos na ansiedade humana impossibilita estabelecer rigorosamente a homologia no padrão de respostas entre animais e humanos. Por isso, uma nova estratégia de pesquisa pré-clínica da ansiedade é necessária para o desenvolvimento de novos modelos animais para diferentes tipos de ansiedade e não apenas aqueles que respondem aos BZDs (RODGERS et al., 1997).

2.1.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Desenvolvido inicialmente por Handley e Mithani (1984) e adaptado para camundongos por Lister (1987), o LCE foi baseado no labirinto em Y proposto por Montgomery (1955). Montgomery mostrou que ratos quando expostos a um labirinto contendo os três braços fechados apresentavam uma permanência de tempo similar em ambos os braços. Em contrapartida, quando o labirinto continha um ou dois braços elevados, os ratos exploravam mais as vielas fechadas e se esquivavam das vielas elevadas do labirinto, sugerindo uma aversão ao ambiente novo com um conflito de aproximação e esquiva.

Handley e Mithani (1984) assumiram o pressuposto de que se Montgomery estivesse correto, fármacos ansiolíticos aumentariam a exploração dos ratos nos braços abertos, enquanto fármacos indutores da ansiedade reduziriam este tempo. Para testar esta hipótese, adaptaram o modelo de Montgomery e criaram o LCE que consistia em um aparato com dois braços fechados (cercado por paredes) e dois braços abertos opostos em cruz e, todo o aparato, elevado a aproximadamente 70 cm do nível do chão. Após administração de clordiazepóxido, etanol e pentobarbital sódico, com ação ansiolítica já relatada, os animais aumentaram a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), assim como, o número de entradas, confirmando a hipótese anteriormente sugerida (HANDLEY; MITHANI, 1984).

Assim, o LCE baseia-se na resposta inata de medo/ansiedade do animal diante de situações naturalmente aversivas. O animal quando colocado no teste, apresenta um padrão característico de esquiva dos braços abertos, permanecendo mais tempo nos braços fechados (BOURIN et al., 2007). Este padrão é suprimido pela administração de drogas ansiolíticas, e.g., o diazepam, permitindo o animal explorar mais os ambientes abertos. As medidas espaço-temporais convencionais anotadas no LCE são o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo gasto em ambos os braços (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987).

Comportamentos etológicos também podem ser mensurados no LCE e possuem grande utilidade no estudo de drogas ansiolíticas/ansiolíticas. Estes comportamentos são definidos como movimentos ou posturas que sinalizam, para outros animais da mesma espécie ou de outras, disposição de comportamentos de agressão, de submissão, de aflição ou sexuais. Estes comportamentos incluem a postura estendida (SAP, do inglês *stretched attend posture*; postura exploratória em que o animal se estende para frente e retorna à posição original sem locomoção para frente), imersão de cabeça desprotegida (uHP, do inglês

unprotected head-dipping) e os REA. Quando associados aos parâmetros clássicos (espaço-temporais) aumentam a sensibilidade do teste (RODGERS et al., 1997).

2.1.3 Caixa claro-escuro (CCE)

A CCE se assemelha ao LCE por se basear na aversão inata do animal a um ambiente novo e luminoso (secção aberta), como também, no comportamento exploratório espontâneo do animal em resposta a este novo ambiente (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CRAWLEY, 1981). O aparato, desenvolvido por Crawley e Goodwin (1980), é formado por dois compartimentos (claro e escuro) interconectados, que permite ao animal explorar livremente ambos os compartimentos. Quando o animal é inserido na secção clara do aparato, rapidamente se move para a secção escura, sendo este comportamento revertido pelo uso de fármacos ansiolíticos (COSTALL et al., 1989). Crawley (1981) após administrar diversos benzodiazepínicos intraperitonealmente em camundongos machos, *e.g.*, diazepam e flurazepam, observou uma maior atividade exploratória do animal entre as secções claro-escuro. Depois de validado por Costall et al. (1989) o modelo animal tornou-se um dos mais utilizados para o screening de fármacos ansiolíticos.

Atualmente, os principais parâmetros avaliados no teste constituem: a latência para entrada no compartimento escuro, o número de transições entre os compartimentos claro-escuro, o tempo de permanência e a exploração do animal em cada compartimento (COSTALL et al., 1989; HASCÖET; BOURIN, 1998). Um parâmetro considerado importante na CCE consiste na linhagem e idade dos animais. Hascöet e Bourin (1998) ao comparar a performance de camundongos *Swiss* machos com diferenças de idade e peso, observou que animais com idade de 4 semanas respondiam melhor ao teste em comparação a animais mais idosos que apresentavam uma menor atividade no teste.

2.1.4 Campo aberto (CA)

Inicialmente desenvolvido por Hall (1934) para ratos, o CA era constituído por um assoalho de tecido e circundado por paredes altas (2 m) de folhas de estanho com 8 m de diâmetro. Ratos machos e fêmeas, privados ou não de ração, eram inseridos individualmente na extremidade do aparato durante 2 minutos diariamente por um período de 14 dias. O aparato foi utilizado para verificar os níveis de defecação, de micção e o tempo de permanência do animal na periferia (tigmotaxia); parâmetros relacionados com o comportamento emocional e do tipo ansioso do animal. De forma geral, o teste envolve o confronto do animal com o ambiente novo.

O CA também avalia a atividade locomoção espontânea do animal (RAMOS et al., 2008). O animal é colocado no centro ou próximo das paredes do aparelho e os parâmetros como locomoção horizontal (número de cruzamentos das linhas marcadas no chão) e número de *rearings* são mensurados (PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976). Associado ao CA, outros testes de avaliação da atividade locomotora podem ser utilizados, como o *Rota-rod* (RR). Inicialmente desenvolvido por Dunham e Miya (1957), o RR juntamente com o CA consiste na principal abordagem para avaliação da atividade locomotora do animal. Entretanto, diferentemente do CA que avalia a atividade locomotora espontânea do animal, o RR avalia a atividade forçada. No teste, podem ser avaliados cinco fatores envolvidos na função motora do animal: (i) equilíbrio dinâmico; (ii) coordenação motora; (iii) planejamento motor; (iv) aprendizagem motora; e (v) condições físicas gerais (PINTO; KO, 2012).

2.1.5 Um novo modelo animal de ansiedade: doses subconvulsivantes de pilocarpina – um agonista não seletivo de receptores muscarínicos da acetilcolina (ACh)

Em uma escala filogenética, o neurotransmissor ACh é encontrado em animais, plantas e seres unicelulares. Nos animais, tem um importante papel no sistema nervoso, *e.g.*, controle do sistema esquelético muscular, da frequência e força de contração cardíaca, da secreção glandular e auxílio nos processos cognitivos (VENTER et al., 1988). Além disso, diferentes estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado o envolvimento do sistema colinérgico nos comportamentos relacionados com medo, ansiedade e depressão (CURRAN et al., 1991; SMYTHE et al., 1996).

A ACh exerce seus efeitos biológicos por meio de dois tipos diferentes de receptores: os receptores nicotínicos (nAChRs) e os receptores muscarínicos (mAChRs); ambos encontram-se amplamente distribuídos no cérebro, *e.g.*, no hipocampo, na amígdala (AMG) e na região cortical; onde podem participar de diversas funções (VAN DER ZEE; LUITEN, 1998). Por exemplo, no hipocampo, a ativação dos receptores nAChRs e mAChRs são responsáveis por modular a excitabilidade celular e a transmissão sináptica da circuitaria hipocampal, que por sua vez, tem um importante papel na regulação dos níveis de ansiedade (GRAY e McNAUGHTON, 2000; RUIVO TELES-GRILLO; MELLOR, 2013).

A PILO é um agonista não seletivo de receptores mAChRs. Em sua primeira descrição, Turski et al. (1983) observaram que a administração de PILO (400 mg/Kg, i.p.) em ratos estimulava de tal modo os receptores colinérgicos que produziam alterações comportamentais e eletroencefalográficas (nas regiões límbicas; hipocampo, amígdala e

córtex) duradouras, resultando em crises motoras generalizadas características do status epilepticus (SE). No ano seguinte, Turski et al. (1984) observaram essas alterações após a administração de PILO em camundongos. Desde então, a PILO é amplamente utilizada como um modelo de epilepsia do lobo temporal (ELT); o tipo mais comum de epilepsia em adultos (BLAIR et al., 2012; LEITE et al., 1990).

De todas as comorbidades associadas à epilepsia, os transtornos de ansiedade e de humor são os mais comuns (SWINKELS, 2005). Um estudo multicêntrico realizado nos Estados Unidos apontou uma prevalência da ansiedade em 30,4% dos indivíduos com epilepsia (JONES et al., 2005). Estas comorbidades podem coexistir com a epilepsia por estarem diretamente relacionadas à atividade convulsiva ou associadas ao estado pós-ictal (BORO; HAUT, 2003). Sabe-se que muitas funções cerebrais estão atreladas a circuitaria colinérgica hipocampal, *e.g.* a memória e a aprendizagem (LENT, 2010; ROUSE et al., 1999), as respostas neuroendócrinas (JURUENA et al., 2004), as emocionais e os estímulos aversivos (MENESES, 2011).

Em virtude da relação intrínseca entre epilepsia e os transtornos mentais e de humor, diversos estudos estão sendo direcionados afim de investigar as alterações comportamentais na ansiedade em modelos animais de PILO com indução do SE (LOPES et al., 2016). Entretanto, estudos recentes têm observado um comportamento tipo ansioso após a administração de uma dose subconvulsivante (não indutora de SE) de PILO em ratos Wistar machos (DUARTE et al., 2010, 2013; HOELLER et al., 2016). No primeiro desses estudos, Duarte et al. (2010; 2013) demonstraram que a administração intraperitoneal de PILO (150 mg/Kg) produz um efeito do tipo ansiogênico de longa duração em diferentes modelos de ansiedade, bem como um aumento, 1 mês após a injeção, no ritmo teta hipocampal. Esses resultados somados aos da literatura envolvendo o sistema colinérgico nos comportamentos relacionados com medo e ansiedade levaram Duarte et al. (2010; 2013) a sugerir a administração de doses subconvulsivantes de PILO como um modelo de ansiedade-traço.

Entretanto, um critério importante no desenvolvimento de modelos animais para estudar psicopatologias envolve estabelecer a validade do modelo quanto à verdadeira representação dos processos que estão sendo estudados. Nesse sentido, o presente estudo teve por um dos objetivos validar a administração única de doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de PILO como um modelo de ansiedade-traço em roedores ao corroborar e estender resultados prévios da literatura obtidos com ratos Wistar machos em camundongos *Swiss* de ambos os gêneros.

2.1 Transtornos de depressão

No séc. 15 a.C., Hipócrates forneceu a primeira descrição sobre melancolia como sendo “um medo ou tristeza de longa duração associado a sintomas de aversão ao alimento, desânimo, insônia, irritabilidade e inquietação”. A observação de que a tristeza ou medo deveriam ser prolongados proporcionou a primeira relação entre desproporção da realidade como aspecto fundamental na desordem depressiva. Além disso, a definição proposta não restringia a depressão a um transtorno autônomo, mas sim, já associado a outras condições, como a ansiedade (JONES; WITHINGTON, 1923 apud HORWITZ et al., 2016).

Anos se passaram desde a sua primeira descrição e a depressão continua sendo um importante problema de saúde mental. Em geral, a depressão é caracterizada pela perda ou diminuição de interesse e prazer pelas atividades do dia a dia. Por afetar a capacidade intelectual e social e por algumas vezes direcionar o indivíduo ao suicídio, a depressão é considerada uma grave doença que necessita ser diagnosticada e tratada o mais precocemente possível (ANXIETY AND DEPRESSION ASSOCIATION OF AMERICA; AADA, 2016; NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH; NIMH, 2016; APA, 2013).

De acordo com a DSM-V (APA, 2013), os transtornos depressivos podem ser classificados em: transtorno disruptivo da desregulação do humor; transtorno depressivo maior (DM); transtorno depressivo persistente (distímia); transtorno disfórico pré-menstrual; transtorno depressivo induzido por substância/medicamento; transtorno depressivo devido à outra condição médica; outro transtorno depressivo especificado; e transtorno depressivo não especificado (Quadro 3). Todos os transtornos possuem a característica de humor triste, vazio ou irritável compartilhado e associado a alterações somáticas e cognitivas (APA, 2013). Além disso, familiares de primeiro grau de parentesco de pacientes com DM possuem o risco de 1,5 a 3 vezes maior de desenvolver quadros semelhantes de depressão ao longo de sua vida, quando comparado com a população em geral, agravando ainda mais a problemática deste transtorno (GRAEFF, 1999).

Quadro 3. Tipos de transtornos depressivos descritos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V.

Tipo do transtorno depressivo	Principais características
Transtorno disruptivo da desregulação do humor	Irritabilidade crônica grave com explosões de raiva recorrentes manifestadas pela linguagem e/ou comportamento, presentes por 12 meses ou mais, em pelo menos três ambientes (<i>e.g.</i> , casa, escola, com pares).
Transtorno depressivo maior (DM)	Humor deprimido na maior parte do dia em quase todos os dias com acentuada diminuição do interesse ou prazer na maior parte das atividades presentes em pelo menos duas semanas. Pensamentos recorrentes de morte podem estar presentes.
Transtorno depressivo persistente (distímia)	Humor deprimido na maior parte do dia, na maioria dos dias, pelo período mínimo de dois anos. Sintomas como apetite diminuído ou em excesso, insônia ou hipersonia, baixa energia ou fadiga podem estar presentes.
Transtorno disfórico pré-menstrual	No período pré-menstrual, a labilidade afetiva, irritabilidade ou raiva estão acentuadas e associadas com sintomas de ansiedade.
Transtorno depressivo induzido por substância/medicamento	Sintomas do tipo depressivo desenvolvidos durante ou até um mês após o uso de uma substância (<i>e.g.</i> , droga de abuso e medicamento psicoterápico).
Transtorno depressivo devido à outra condição médica	Humor deprimido e persistente ou acentuada perda de interesse ou prazer relacionado com outra condição médica (<i>e.g.</i> , doença de Parkinson, doença de Huntington).
Outro transtorno depressivo especificado	Sintomas do tipo depressivo que não satisfazem os critérios para qualquer transtorno depressivo específico.
Transtorno depressivo não especificado	Sintomas do tipo depressivo não satisfazem todos os critérios para qualquer transtorno na classe diagnóstica dos transtornos depressivos. Clínico não tem acesso a informações suficientes para um diagnóstico específico.

Fonte: DSM-V, 2013.

2.1.2 Modelos animais de depressão

Os testes animais para depressão foram originalmente desenvolvidos com base em comportamentos consequentes ao estresse, uso de drogas, lesões de estruturas cerebrais ou manipulações genéticas (CRYAN et al., 2002). Exemplos de medidas que podem ser avaliadas em modelos animais para a depressão incluem respostas motoras, respostas de recompensa e interação social (Quadro 4). Estes parâmetros refletem, respectivamente, níveis de desamparo ou desespero, anedonia e retraimento social que constituem características relevantes à depressão humana (DUMAN, 2010). De fato, existem muitas características na depressão humana que se mostram homólogas ao comportamento, por exemplo, dos roedores.

Por isso, modelos animais têm sido desenvolvidos para melhorar a compreensão sobre os substratos neurais envolvidos nos transtornos depressivos humano (POWELL et al., 2012).

Quadro 4. Revisão dos principais testes animais empregados para avaliação dos transtornos depressivos em laboratório. (Continuação)

Princípio do teste	Teste e breve descrição	Ilustração
Baseia-se na pré-exposição ao estresse inescapável (choque elétrico nas patas).	<u>Desamparo aprendido</u> Quando existe a possibilidade de fuga do choque, o animal depressivo mostra redução na habilidade de escapar.	
Baseia-se na submissão do animal ao estresse inescapável (cilindro com água).	<u>Nado forçado</u> O animal depressivo passa mais tempo imóvel na água. Este comportamento associa-se a uma desistência mais rápida na luta em fugir.	
Baseia-se na submissão do animal ao estresse inescapável (cauda presa).	<u>Suspensão pela cauda</u> O animal depressivo passa mais tempo imóvel. Este comportamento associa-se a uma desistência mais rápida na luta em fugir.	
Baseia-se no comportamento do animal em resposta a situações imprevisíveis de estresse, e.g., privação de ração e água.	<u>Estresse crônico moderado</u> Ao longo da exposição do estresse sequencial e inescapável, o animal depressivo desenvolve gradualmente a anedonia, ou seja, a perda do prazer.	
Baseia-se na exposição a situações adversas estressantes no início da vida do animal, e.g., privação materna e estresse prenatal.	<u>Privação materna</u> Animais previamente separados de suas mães mostram comportamentos anormais quando adultos, e.g., motivação social reduzida, distúrbios de sono e apetite e alterações no eixo HPA.	
Baseia-se na exposição a situações adversas estressantes no início da vida do animal, e.g., privação materna e estresse prenatal.	<u>Estresse prenatal</u> A prole de mães exposta a situações estressantes, e.g, barulho intenso, durante o período gestacional são mais predispostas à depressão e apresentam alterações no eixo HPA.	

Fonte: Autora, 2017.

A exposição ao estresse é o principal fator ambiental de risco associado a ocorrência da depressão (DUMAN, 2010). Um dos modelos de avaliação de fármacos com atividade antidepressiva mais utilizados na clínica, que busca mimetizar este fator determinante é o teste de nado forçado (TNF). No teste, o pré-tratamento com antidepressivos mostrou-se eficaz em reduzir o tempo de imobilidade e produzir uma alteração completa do comportamento de anedonia à luta contínua (DUMAN, 2010).

2.1.3 Teste do nado forçado (TNF)

Porsolt et al. (1977; 1978), ao submeter ratos no teste do labirinto aquático, observaram que aqueles que falharam ao realizar a performance no labirinto, flutuavam passivamente ao invés de nadarem ativamente até a plataforma de escape. A partir disso, os pesquisadores observaram que quando forçados a nadar em um cilindro de água do qual não poderiam escapar, os ratos se adaptavam, após um período inicial de atividade natatória alta e permaneciam em uma postura imóvel, com os movimentos necessários apenas para manter a cabeça fora da água. Além disso, observaram que o comportamento de imobilidade era reduzido após administração de antidepressivos tricíclicos já eficazes na clínica médica, *e.g.*, a imipramina. Este efeito era dose-dependente, uma vez que, em doses maiores diminuía a atividade locomotora espontânea no CA como efeito sedativo. A imobilidade poderia ser facilitada pela pré-exposição do animal ao teste (pré-teste), geralmente, 24h antes. Em adição, outros fatores foram vistos para diminuir o tempo de imobilidade do animal; choques eletroconvulsivantes, privação do sono REM, enriquecimento ambiental e psicoestimulantes, *e.g.*, a cafeína, este último com aumento da atividade locomotora espontânea no CA (PORSOLT et al., 1977; 1978).

Posteriormente, o TNF sofreu modificações e foi adaptado para um cilindro com água o suficiente que o animal não tocasse com as patas o assoalho (mínimo de 10 cm) e nem conseguisse escapar pela parte superior (mínimo de 15 cm). O tempo de duração foi determinado em 6 minutos e uma vez o animal inserido na água, deveria haver um período mínimo de habituação de 2 minutos antes do registro do movimento (CAN et al., 2012). Embora, a imobilidade do TNF seja diminuída por fármacos monoaminérgicos, a sensibilidade do teste não é exclusiva para esta classe farmacológica. Substâncias como a DA (YAMADA et al., 2004) e a ACh (ANDREASEN et al., 2008) também se mostram eficazes na redução da imobilidade no TNF.

2.2.3 Doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de pilocarpina – um novo modelo animal de depressão?

Pacientes com transtornos depressivos geralmente experimentam a sintomatologia dos transtornos de ansiedade, sendo o inverso verdadeiro também (TILLER; 2012). Por exemplo, um estudo epidemiológico realizado na Austrália em 2012, demonstrou que os indivíduos com GAD apresentavam comorbidades associadas sendo que 59% atendiam a critérios diagnósticos para os transtornos depressivos (HUNT et al., 2002). Uma das justificativas mais plausíveis para a comorbidade ansiedade/depressão pode ser explicada por características genéticas compartilhadas que tornam o indivíduo vulnerável a ambos os transtornos (GORMAN, 1996; MIDDELDORP et al., 2005).

Os transtornos de ansiedade e depressão compartilham fatores etológicos comuns com o neuroticismo; tendência para experimentar emoções negativas (MIDDELDORP et al., 2005). Os transtornos também compartilham o mesmo tratamento farmacológico, *e.g.*, o tratamento de primeira escolha para o GAD são os antidepressivos que envolvem outras vias neurobiológicas diferentes das do BZDs, enfatizando ainda mais a relação intrínseca entre a ansiedade e depressão (GRAEFF, 1999).

Ao relacionar as semelhanças genéticas e neurobiológicas entre os transtornos de ansiedade e depressão com os resultados encontrados por Duarte et al. (2010; 2013), que sugerem a administração única de doses subconvulsivantes de PILO como um modelo de ansiedade-traço em roedores, pode-se inferir a hipótese de doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de PILO como um modelo de depressão ou, no mínimo, de induzir comportamentos do tipo depressivo em roedores. Para investigar tal hipótese, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o efeito da administração de doses intermediárias de PILO em camundongos submetidos a um teste de depressão.

3 EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), a incidência de indivíduos com transtornos mentais está em ascensão em todos os países. De fato, entre os anos de 1990 e 2013 o número de indivíduos acometidos por ansiedade e/ou depressão aumentou aproximadamente em 50%, passando de 416 milhões para 615 milhões de pessoas. Cerca de 30% da carga global de doenças não fatais está associada aos transtornos mentais. Devido ao estigma associado a estas comorbidades, muitos indivíduos afetados relutam em buscar auxílio profissional ou ainda, em suas comunidades, muitas vezes desfavorecidas, não existem recursos suficientes para prestar o atendimento necessário. Por isso, apesar do aumento alarmante da prevalência dos transtornos mentais, a representatividade destes dados pode ser considerada subestimada (BANDELOW et al, 2015).

São escassos os estudos epidemiológicos de transtornos mentais não somente no Brasil, mas de uma forma geral, em todos os países. A primeira grande pesquisa, de base populacional, com critérios diagnósticos padronizados foi realizada nos EUA em 1977, o Estudo da Área de Captação Epidemiológica do Instituto Nacional de Saúde Mental (ECA-NIMH, do inglês *National Institute of Mental Health multisite Epidemiologic Catchment Area*, 1991; ROBINS; REGIER, 1992). Neste estudo, aproximadamente 1/4 da amostra de quase 20.000 indivíduos apresentou algum transtorno de ansiedade em algum momento da vida. Em um estudo mais recente, Kessler et al. (2012) demonstraram que os transtornos de ansiedade continuam a ser um grave problema de saúde pública entre os americanos com uma estimativa de prevalência de 33,7% ao longo da vida. No Brasil, em 1991, um estudo multicêntrico realizado por Almeida-Filho et al. (1997), em três centros urbanos (Brasília, São Paulo e Porto Alegre) revelou que dentre as comorbidades psiquiátricas, os transtornos de ansiedade foram os mais prevalentes ($\pm 18\%$). Na área metropolitana de São Paulo, Andrade et al. (2012) revelaram que os transtornos de ansiedade continuam prevalentes, com uma estimativa de 19,9% ao ano.

Os indivíduos acometidos pela depressão sofrem desproporcionalmente de incapacidade e mortalidade que de fato, pessoas depressivas estão pré-dispostas a desenvolverem problemas cardíacos (infarto do miocárdio) e diabetes (WHO, 2013). Além disso, existem associações comprovadas, assim como alguns relatos neuroanatômicos, da depressão com o acidente vascular cerebral (AVC), doença de Huntington, doença de Parkinson e lesão cerebral traumática. Com relação às alterações neuroendócrinas, a depressão está intimamente correlacionada à síndrome de Cushing e ao hipotireoidismo (APA, 2013).

A depressão é considerada a condição incapacitante mais prevalente entre indivíduos de zero a 59 anos de idade nos países de alta renda (prevalência estimada de 15,8%) e, em países de baixa e modera renda, com uma prevalência significativamente superior de 77,6% (WHO, 2004). O suicídio, predito pela depressão, é responsável por mais de 800 mil mortes anuais mundialmente e a tentativa de suicídio chega a ultrapassar esse valor. Similarmente à depressão, uma taxa superior dos suicídios (75%) acontece em países de baixa e moderada renda. Em 2012, o suicídio foi considerado a segunda principal causa de morte nos indivíduos entre 15-29 anos de idade no mundo. Dentre os países das Américas, o Brasil é considerado 14º país com maior taxa de suicídio (6 a cada 100.000 habitantes) (WHO, 2012; 2017).

De acordo com a Associação Americana de Ansiedade e Depressão (do inglês, *Anxiety and Dpression Association of America*, AADA; 2016), as mulheres são cerca de duas vezes mais propensas a desenvolverem transtornos de ansiedade e/ou depressão em comparação aos homens. Por exemplo, as mulheres são as que mais sofrem com transtorno de pânico (mulheres: 7%; homens: 3,3%) nos EUA (KESSLER et al., 2012). Por isso, uma maior prevalência, incidência e morbidade relacionadas a transtornos mentais e de humor são maiores ao longo da vida no gênero feminino. Diferenças neurobiológicas podem ser em parte, responsáveis por estas desigualdades epidemiológicas. Por exemplo, o sistema cerebral envolvido na resposta de luta ou fuga é ativado mais rapidamente e perdura por mais tempo ativo em mulheres do que em homens, em parte, devido à liberação do estrógeno e progesterona. Em paralelo as alterações hormonais, à susceptibilidade biológica e as variáveis, *e.g.*, demanda sociodemográfica influenciam fortemente o desenvolvimento desses transtornos (NOLEN-HOEKSEMA, 2001; NEMENTH et al., 2013).

4 TRATAMENTO PARA OS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Os transtornos de ansiedade e depressão são condições neuronais complexas que precisam de intervenção psicológica e/ou farmacológica. Como resultado de investimentos limitados nos cuidados com a saúde mental pública, uma lacuna substancial entre a necessidade de tratamento e sua disponibilidade afeta diretamente a melhoria na evolução da doença. Esta grande lacuna de tratamento afeta não apenas a saúde e o bem-estar do acometido pelos transtornos mentais, mas também, possui consequências imensuráveis para empregadores e o governo, como resultado da diminuição da produtividade do trabalho, da saúde e de despesas sociais (CHISHOLM et al., 2016). Entre os 36 maiores países do mundo, na ausência de um tratamento adequado para os transtornos mentais, estima-se que mais de 12 bilhões de dias de produtividade são perdidos devido à ansiedade e aos transtornos depressivos (CHISHOLM et al., 2016).

Os tratamentos disponíveis atuais para os transtornos mentais incluem: a farmacologia, a psicoterapia, *e.g.*, a terapia cognitiva-comportamental, e os tratamentos alternativos. Para a depressão grave e resistente, a eletroconvulsoterapia (ECT) pode ser aplicada (KELLNER et al., 2012). Estudos recentes apontam a estimulação magnética transcraniana (MARTIN et al., 2003) e do nervo vago (GEORGE et al., 2003) como novas opções de tratamento. Embora estes últimos sejam utilizados desde a década de 80, não constituem tratamento de primeira escolha em virtude dos riscos e efeitos colaterais. Por exemplo, a ECT pode induzir crises e lesionar tecidos com danos significativos na memória e cognição (TYE, 2014).

4.1 Tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade

A droga ansiolítica mais antiga e conhecida nas civilizações é o álcool etílico ou etanol, componente de muitas bebidas de consumo popular deste tempo remotos, *e.g.*, a cerveja, o vinho e os destilados. Embora apresente um efeito ansiolítico, o potencial tóxico do etanol é superior aos seus benefícios o que o torna não recomendado como medicamento na ansiedade. No século XIX, além do etanol, outras substâncias como os sais de brometo foram introduzidas no tratamento da ansiedade patológica. Entretanto, os brometos tinham efeito sedativo moderado e diversos efeitos colaterais e/ou tóxicos por liberarem íons bromo. Em virtude disso, na época, aconteceu um declínio do consumo desta substância (GRAEFF, 1999; BERNIK et al., 1990).

No início do século XX, os barbitúricos foram introduzidos na prática clínica; o barbital e o fenobarbital. Estes compostos, conforme o aumento da dose induzia a sedação, anestesia geral, coma e levava a morte. Apesar disso, até o surgimento dos BZDs, os

barbitúricos foram amplamente utilizados no tratamento da ansiedade (GRAEFF, 1999; BERNIK et al., 1990).

Em geral, os BZDs são muito lipossolúveis, absorvidos completamente no trato gastrointestinal e cruzam com facilidade a barreira hematoencefálica. O modo de ação ansiolítico dos BZDs acontece por sua ligação a receptores próprios localizados no complexo receptor GABA_A, que é formado por cinco subunidades glicoprotéicas que se unem para delimitar um canal de cloreto (Cl⁻). Os BZDs atuam como moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A, encontrado em altas concentrações no córtex e sistema límbico. A ligação dos BZDs ao seu receptor provoca uma mudança conformacional no canal de Cl⁻ do receptor GABA_A e conseqüentemente, a hiperpolarização celular pelo aumento da corrente de Cl⁻ para o interior da célula (ANDREATINI et al., 2001; GRIFFIN et al., 2013).

A presença de efeitos colaterais adversos atrelados ao uso de BZDs é uma limitação da sua utilização e preocupação da clínica médica. Em dosagens maiores, euforia, comprometimento da coordenação motora e desorientação podem estar presentes. Tolerância, dependência e retirada são geralmente associadas ao uso prolongado desta classe farmacológica. Além disso, outras substâncias depressoras do SNC, *e.g.*, o álcool, podem potencializar o efeito dos BZDs. Com isso, atividades diárias envolvendo a rotina dos pacientes podem estar comprometidas, *e.g.*, dirigir ou manusear máquinas que exigem uma atenção redobrada (GRIFFIN et al., 2013).

Em virtude da presença dos diversos efeitos colaterais, a utilização de alternativas farmacoterapêuticas aos BDZ aumentou de forma significativa, *e.g.*, a buspirona e os antidepressivos; ansiolíticos não BDZs que interferem diretamente na neurotransmissão serotoninérgica (GRAEFF, 1999). Como existe uma propensão dos BZDs de induzir dependência, quando empregados por mais de seis semanas, os inibidores seletivos da reuptake de serotonina (SSRIs, do inglês *selective serotonin reuptake inhibitors*) passaram a ser medicação de primeira escolha no tratamento da ansiedade crônica (GRAEFF, 1999).

O principal desafio no estudo dos transtornos de ansiedade continua sendo a identificação de novos medicamentos desprovidos das limitações de eficácia e tolerabilidade, características dos fármacos atuais disponíveis. Por isso, novas vias neuronais, *e.g.*, o sistema endocanabinoide, o neurotransmissor glutamato e os neuropeptídeos, possivelmente envolvidos nestes transtornos, vêm sendo alvos de pesquisas científicas que buscam uma melhor compreensão e conseqüentemente, o desenvolvimento de terapias alternativas para o seu tratamento (GRIEBEL; HOLMES, 2013).

4.2 Tratamento farmacológico dos transtornos de depressão

A descoberta de drogas para o tratamento dos transtornos depressivos teve início em 1949, quando o psiquiatra John Cade observou um efeito sedativo em animais tratados com lítio. Em seguida, o pesquisador tratou alguns pacientes com sucesso. Entretanto, como não se conhecia profundamente o mecanismo de ação neural do lítio, quadros de ineficácia e toxicidade eram comuns. No ano seguinte, observou-se que pacientes tuberculosos quando tratados com iproniazida apresentavam alterações benéficas no humor. Posteriormente, descobriu-se que além da ação farmacológica na tuberculose, a iproniazida também inibia a enzima monoaminoxidase (MAO); enzima responsável pela degradação de monoaminas, *e.g.*, a serotonina (5-HT). No mesmo ano, o psiquiatra Roland Kuhn observou que após a administração da imipramina, pacientes esquizofrênicos com sintomas depressivos apresentavam uma melhora no humor, sugerindo a imipramina como um potencial antidepressivo (GRAEFF 1999).

Atualmente, os sintomas dos transtornos de depressão respondem a diferentes classes de fármacos. Existem basicamente três classes de fármacos antidepressivos: os inibidores da receptação de monoaminas, *e.g.*, os tricíclicos e os SSRIs, e os inibidores da enzima monoaminoxidase (MAOI, do inglês *monoamine oxidase inhibitors*) e os fármacos que agem em múltiplos neurotransmissores/receptores, como a trazodona, nefazodona e mirtazapina, sem ter como alvo outros sítios receptores cerebrais não relacionados com a depressão (tais como a histamina) (GRAEFF, 1999; POWERS, 2005).

Por apresentarem menos efeitos colaterais em comparação com as outras classes farmacológicas, os SSRIs e inibidores seletivos da receptação de noradrenalina (NE) e 5-HT (SNRIs, do inglês *serotonina-norepinephrine reuptake inhibitor*) constituem o tratamento de primeira escolha para os transtornos de depressão. Os SSRIs aliviam os sintomas bloqueando a receptação e reabsorção de 5-HT por células nervosas cerebrais. Assim, mais 5-HT permanece disponível na fenda sináptica, melhorando o humor. Os SNRIs são tão eficazes como os SSRIs e aumentam os níveis de NE e 5-HT cerebrais ao inibirem sua reabsorção por células nervosas (ADAA, 2016).

Os MAOI são o segundo maior grupo de antidepressivos disponíveis para o tratamento na depressão. Geralmente são prescritos quando o tratamento de primeira escolha não funciona. A utilização do MAOI requer uma atenção importante visto que esta classe possui uma significativa toxicidade quando utilizada em combinação com alimentos, *e.g.*, vinho e queijo, e outros medicamentos, *e.g.*, fármacos cardiovasculares, uma vez que podem levar a hipotensão (ADAA, 2016; GRAEFF, 1999).

Apesar da disponibilidade de uma amplitude de fármacos antidepressivos, em virtude dos efeitos colaterais e da resistência por muitos pacientes, estima-se que 30 a 50% deles são ineficazes para os pacientes conhecidos como fármacos-resistentes, limitando a utilização dos antidepressivos atuais (TOFOLI et al., 2011). O desafio na terapia dos transtornos de depressão é similar aquele encontrado no tratamento dos transtornos de ansiedade, i.é., identificar medicamentos alternativos desprovidos dos efeitos colaterais e tolerabilidade, características dos fármacos disponíveis atualmente.

5.1 Geral

Fortalecer e estender a validação da administração única de doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de pilocarpina como um modelo de ansiedade-traço e caracterizar como um modelo de depressão em camundongos *Swiss*.

5.2 Específicos

- Determinar as doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de pilocarpina por meio da caracterização comportamental proposta na Escala de Racine quanto a gravidade das crises convulsivas.
- Avaliar a atividade elétrica no córtex e hipocampo de camundongos *Swiss* fêmeas 24h após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina.
- Avaliar os efeitos comportamentais 24 horas e 30 dias após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina em camundongos *Swiss* machos e fêmeas submetidos a diferentes testes de ansiedade e de locomoção.
- Avaliar os efeitos comportamentais 24 horas e 30 dias após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina em camundongos *Swiss* machos e fêmeas submetidos ao teste de depressão.

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas adultos, com idade aproximada de 60 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL). Os animais foram mantidos durante o período experimental no biotério setorial do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa (LNFI/UFAL). Os animais permaneceram alojados em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola), mantidos em uma sala com temperatura (21 ± 2 °C) e ciclo de luz claro-escuro de 12h controlado automaticamente (luzes ligadas às 7h). Todos os experimentos foram realizados durante o ciclo claro entre 12 e 18h. Os animais receberam água e comida *ad libitum*, exceto durante a vigência dos experimentos. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL, Protocolos nº 17/2014 (ANEXO 1) e 22/2015 (ANEXO 2). Antes de cada experimento, os animais permaneceram por no mínimo 1h no interior da sala de experimentação para ambientação.

6.2 Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções para o tratamento dos animais: brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg; a fim de evitar os efeitos colinérgicos periféricos de PILO; CLIFFORD et al., 1987), solução salina (NaCl 0,9%) e PILO (nas doses de 75, 150 ou 350 mg/Kg). A solução de PILO foi preparada, para cada dose, com a adição de salina (NaCl 0,9%) para um volume final de 3000 µL. Todas as substâncias foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), com exceção do brometo de metil escopolamina, administrado por via subcutânea (s.c.).

6.3 Escala de Racine

Após o tratamento com PILO, os animais foram observados por noventa (90) minutos, de acordo com a Escala de Racine (1972). As alterações comportamentais foram medidas de acordo com os graus propostos pela escala: 0 – imobilidade; 1 – automatismo facial; 2 – mioclonia de cabeça e pescoço; 3 – clonia de patas anteriores; 4 – elevação sob patas posteriores; 5 – elevação e queda. Como critério de seleção, os animais que apresentaram graus maiores que 3 na Escala de Racine após o tratamento com PILO foram excluídos, pois apresentavam problemas motores que poderiam prejudicar/enviesar as análises comportamentais nos diferentes testes.

6.4 Determinação do ciclo estral

Passados 24h ou 30 dias após a administração de PILO, os camundongos fêmeas foram cuidadosamente imobilizados para a coleta do lavado vaginal para determinação da etapa do ciclo estral. O esfregaço vaginal foi realizado em duplicata por animal. Para uma melhor visualização das células do esfregaço vaginal, utilizamos o kit para coloração rápida em hematologia (Instant Prov). Após a coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio biológico binocular (Bioval, L-1000B) nos aumentos de 4x e 10x.

6.5 Cirurgia estereotáxica para implante dos eletrodos

Os camundongos fêmeas foram tratados com cloridrato de cetamina (10 mg/Kg i.p.) e cloridrato de xilazina (100 mg/Kg i.p.) e, depois de verificada a perda total dos reflexos, imobilizados em um aparelho estereotáxico (Insight[®], modelo EFF 331, Brasil). Em seguida, na parte superior da cabeça de cada animal foi feita a tricotomia e a assepsia com álcool iodado. Ao final, a calota craniana, após a raspagem do periósteo, foi exposta e perfurada com uma broca odontológica (KG 699 PM) para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e dois eletrodos de registro. Os eletrodos foram implantados seguindo as seguintes coordenadas: na região cortical (AP = 1,5; ML = ±1,0; DV = em contato) e CA1 do hipocampo (AP = -2,3; ML = ±1,6; DV = -1,4 mm). As coordenadas foram aferidas em relação ao bregman e de acordo com as coordenadas de Paxinos e Franklin (2008) para estas estruturas. Após a cirurgia cada animal foi colocado numa caixa moradia, dotada de maravalha e uma lâmpada de 40 W, até completa recuperação da anestesia. Os animais foram ainda tratados com Banamine[®] (analgésico, 2,5 mg/Kg, s.c., 1 vez ao dia/2 dias) e Pentabiótico Veterinário[®] (antibiótico, 0,2 mL, i.p., dose única).

6.6 Registro da atividade elétrica cortical e hipocampal

Os registros eletroencefalográficos (EEG) do hipocampo e córtex cerebral foram obtidos através de um sistema digital poligráfico (ADI Sistema Multidisciplinar para Análise e Aquisição de Dados PowerLab 8/35 e LabChart Pro Software; ADI Instruments Pty Ltd, Florida, USA). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa (30 x 20 x 13 cm) no interior de uma gaiola de Faraday (100 x 60 x 70 cm). Em seguida, os eletrodos de registro foram conectados, através de um cabo, ao PowerLab. Os sinais elétricos captados foram amplificados (20.000 vezes), filtrados (0,5 – 60 Hz), digitalizados (taxa amostral de 256 Hz) e enviados a um computador, onde o programa LabChart adquiriu e armazenou os sinais para posterior análise.

6.7 Testes comportamentais utilizados

6.7.1 Rota-rod (RR)

Antes dos tratamentos, os animais foram pré-selecionados, i.é., aqueles animais que permaneceram por pelo menos noventa segundos (90 s) sobre a barra giratória do RR (Insight®, modelo EFF 412, Brasil) foram selecionados e divididos nos diferentes grupos experimentais. Após os tratamentos, os animais foram novamente inseridos no RR seguindo o protocolo experimental (ver adiante). O animal com mais de 3 quedas foi considerado com dano motor. Ao final do experimento, o cilindro giratório foi limpo com álcool a 10% e um novo animal inserido (Figura 1).

Figura 1. Rota-rod (RR). Aparato utilizado para avaliar a atividade locomotora forçada nos camundongos *Swiss*.



Fonte: Autora, 2016.

6.7.2 Teste do campo aberto (CA)

O CA (Insight®, modelo EP 154C, Brasil) utilizado neste trabalho consiste de uma arena circular de acrílico (30 cm de altura e 30 cm de diâmetro), com o piso dividido em oito partes (Figura 2). O animal foi colocado no centro da arena circular do CA para avaliação da atividade locomotora espontânea. Cada animal permaneceu no teste por um tempo de 5 minutos e foi registrado o número de cruzamentos do animal, ou seja, o número de quadrados transpassados com as quatro patas, como também, o comportamento de levantar sob as patas posteriores (REA, do inglês *rearing*). Ao final do experimento, o CA foi limpo com álcool a 10%.

Figura 2. Campo aberto (CA). Aparato utilizado para avaliar a atividade locomotora espontânea nos camundongos *Swiss*.



Fonte: Autora, 2016.

6.7.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE utilizado neste trabalho (Insight®, modelo EP 151 CMO, Brasil) consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), opostos em forma de cruz e elevados a 38,5 cm do nível do chão. Os braços abertos são circundados por barras laterais de 0,25 cm de altura para evitar a queda do animal. A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados foram confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico cinza (Figura 3). No teste, os animais foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e durante 5 minutos, foram registrados: %TBA, a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) e o número de entradas nos fechados (EBF), e os parâmetros etológicos: o número de uHP, de pSAP e de REA. Ao final do experimento, o LCE foi limpo com álcool a 10%.

Figura 3. Labirinto em cruz elevado (LCE). Aparato utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com medo e ansiedade nos camundongos *Swiss*.



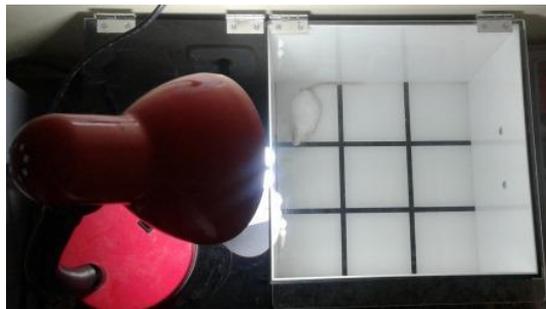
Fonte: Autora, 2016.

6.7.4 Caixa claro-escuro (CCE)

A CCE utilizada neste trabalho (Insight®, modelo EP 157C, Brasil) é construído em acrílico (20,5 x 27,5 x 45,5 cm) e dividida em dois compartimentos: um com revestimento

interno em acrílico de cor branca (20 x 26,5 x 26 cm) e altamente iluminado com auxílio de uma lâmpada fluorescente e um compartimento preto (20 x 26,5 x 17,5 cm) e sem iluminação (Figura 4). Os compartimentos estão conectados entre si por meio de uma abertura (5 X 5 cm). No dia do teste, os animais foram colocados, individualmente no centro do compartimento claro com a cabeça voltada para a porta divisória e observados durante 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: a latência para entrada no compartimento escuro (LECE), o tempo de permanência no compartimento claro (TCC), o número de entradas no compartimento escuro (Nece) e o número de cruzamentos no compartimento claro (CRUZ, avaliado pelo número de quadrados transpassados com as quatro patas). Ao final do experimento, os compartimentos foram limpos com álcool a 10%.

Figura 4. Caixa claro-escuro (CCE). Aparato utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com medo e ansiedade em camundongos Swiss.



Fonte: Autora, 2016.

6.7.5 Teste do nado forçado (TNF)

Neste trabalho, o TNF foi realizado em duas sessões: o pré-teste (24 h antes do teste) e o teste propriamente dito, ambos com uma duração de 6 minutos. Anterior à inserção do animal no teste, um cilindro com capacidade de 2000 mL foi preenchido previamente com água de torneira até 1500 mL, medida que impossibilitava o animal de tocar com suas patas traseiras o assoalho do cilindro. A temperatura da água foi aferida com um termômetro digital infravermelho (Matsuri DT8380) e estabilizada em 26-26,5°C com auxílio do aquecedor elétrico (WAB – 1000 W). A escolha da temperatura foi mediante a padronização anterior do teste no presente laboratório.

Após a temperatura ser estabilizada, o animal foi cuidadosamente inserido no cilindro pela cauda e os parâmetros a seguir foram avaliados: latência para imobilidade e imobilidade nos últimos 4 minutos. Com auxílio de uma divisória, foram realizados dois TNF por vez com cada animal em seu cilindro (Figura 5). Uma cartolina preta foi colocada entre o cilindro e o assoalho de madeira para facilitar a mensuração dos parâmetros avaliados. Ao final dos

experimentos, a água foi descartada e renovada, seguida de uma nova estabilização da temperatura. O animal ao fim do teste foi inserido em uma caixa pequena com papel toalha e com o auxílio de uma lâmpada foi aquecido, onde permaneceu até a pelagem ficar totalmente enxuta.

Figura 5. Teste do nado forçado (TNF). Aparato utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com depressão nos camundongos *Swiss*.



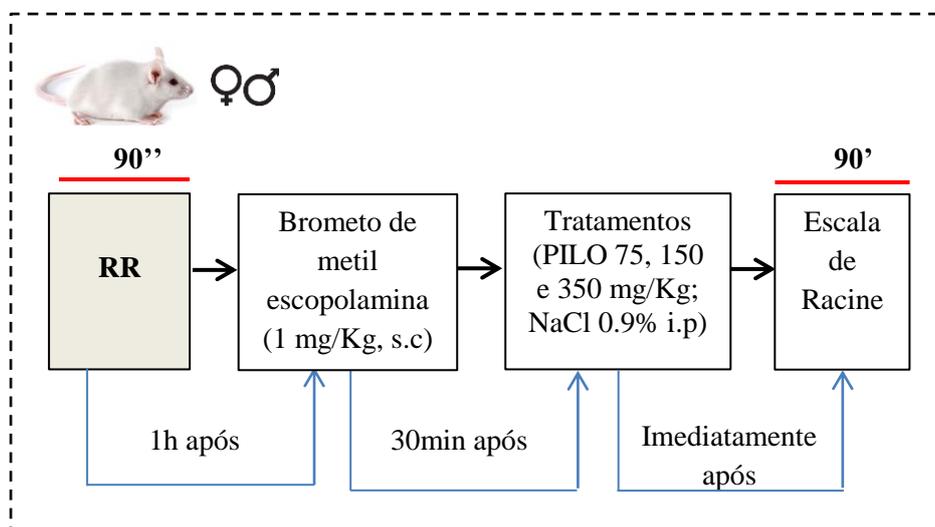
1 preto; 1 vermelho: identificação dos animais no teste. Fonte: Autora, 2016.

6.8 Delineamento experimental

6.8.1 Experimento 1. Determinar as doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de pilocarpina por meio da caracterização comportamental proposta na Escala de Racine (1972) quanto a gravidade

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas foram tratados com brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg, s.c.) e, após 30 min, com salina (NaCl 0.9%, i.p.) ou PILO (75, 150 e 350 mg/Kg, i.p.). Por meio da Escala de Racine, o comportamento do animal foi avaliado para determinar qual dose de PILO se caracterizava como subconvulsivante e/ou intermediária.

Figura 6. Delineamento experimental para avaliação comportamental dos camundongos *Swiss* de acordo com a Escala de Racine.

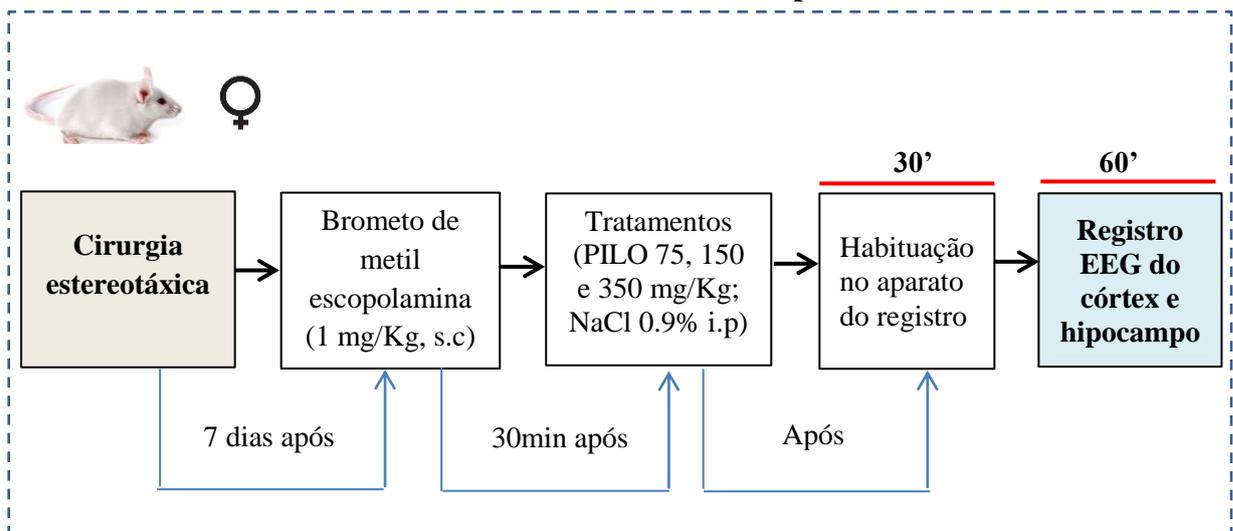


RR= rota-rod.

6.8.2 Experimento 2. Avaliar a atividade elétrica no córtex e hipocampo de camundongos *Swiss* fêmeas 24h após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina

Após 7 dias da cirurgia estereotáxica, camundongos *Swiss* fêmeas foram tratados com brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg, s.c.) e, após 30 min, com PILO (75, 150 e 350 mg/Kg, i.p.). Após o tratamento, os eletrodos inseridos no hipocampo e córtex do animal foram conectados ao sistema para o registro do EEG por um período de 90 minutos cada. Ao final de cada registro, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de tipopental (150 mg/Kg, i.p.). Os animais machos também foram submetidos a cirurgia estereotáxica e análise do EEG, entretanto, devido as interferências no EEG destes animais, os dados não foram apresentados.

Figura 7. Delineamento experimental para a avaliação da atividade eletroencefalográfica (EEG) dos animais tratados com Pilocarpina.



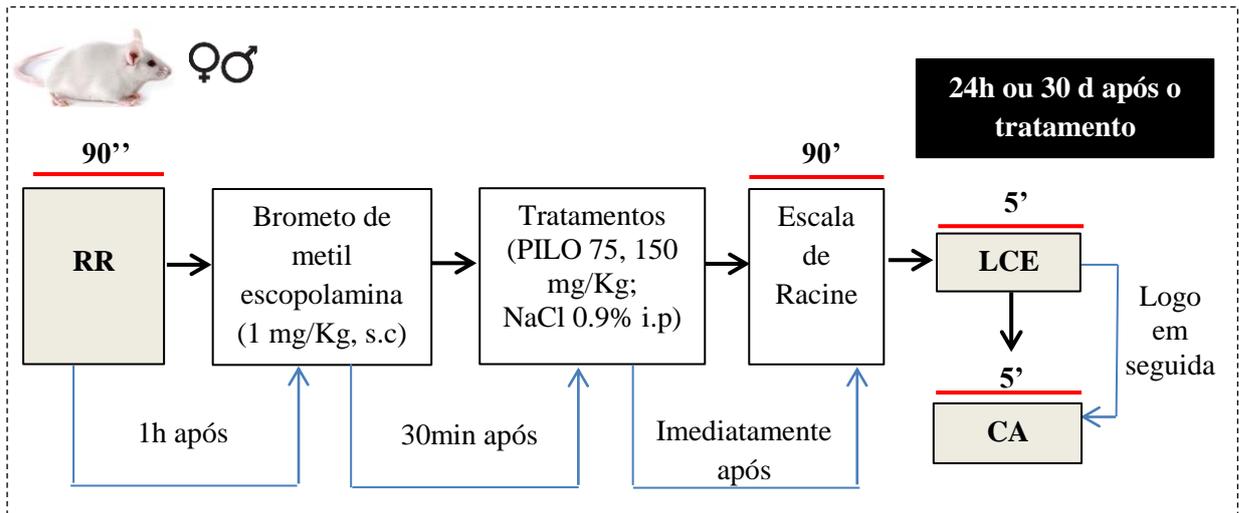
EEG: Registro eletroencefalográfico.

6.8.3 Experimento 3. Avaliação comportamental 24 horas e 30 dias após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina em camundongos machos e fêmeas submetidos a diferentes testes de ansiedade e locomoção.

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas foram tratados com brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg, s.c.) e, após 30 min, com salina (NaCl 0.9%, i.p.) ou PILO (75 e 150 mg/Kg, i.p.). Imediatamente após o tratamento, os animais foram observados de acordo com a escala de Racine por um período de 90 minutos. Após 24 h ou 30 dias do último tratamento, os animais foram submetidos ao LCE (Figura 8) ou ao CCE (Figura 9), para avaliar os níveis de ansiedade, bem como ao RR e/ou CA (Figuras 8 e 9) para avaliação da atividade

locomotora do animal. Um único animal foi colocado por vez em cada aparato comportamental no tempo determinado para cada aparato. Os animais foram colocados individualmente, a exceção do teste do RR, no aparato experimental.

Figura 8. Delineamento experimental para avaliação dos animais nos testes de ansiedade e locomoção 24 horas ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina.

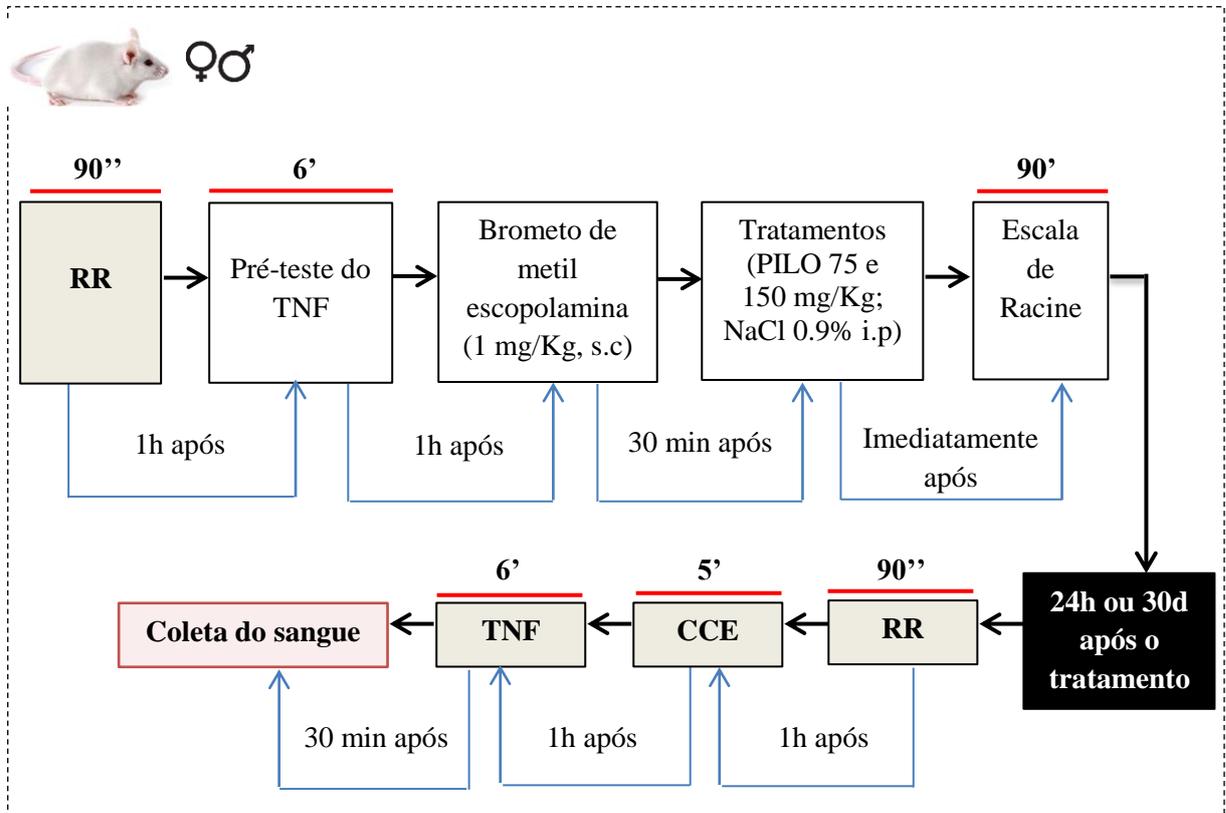


RR= rota-rod, LCE= labirinto em cruz elevado, CA= teste do campo aberto.

6.8.4 Experimento 4. Avaliação comportamental 24 horas e 30 dias após a administração intraperitoneal de doses intermediárias de pilocarpina em camundongos machos e fêmeas submetidos ao teste do nado forçado (teste de depressão)

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas foram tratados com brometo de metil escopolamina (1 mg/Kg, s.c.) e, após 30 minutos, com salina (NaCl 0.9%, i.p.) ou PILO (75 e 150 mg/Kg, i.p.). Imediatamente após o tratamento, os animais foram observados de acordo com a escala de Racine por um período de 90 minutos. Após 24 h ou 30 d do último tratamento, os animais foram submetidos ao TNF, para avaliar os níveis de depressão, bem como ao RR para avaliação da atividade locomotora forçada do animal (Figura 9). Após o TNF, o sangue dos animais foi coletado para a dosagem futura dos níveis sorológicos de corticosterona.

Figura 9. Delineamento experimental para avaliação dos animais nos testes de locomoção e depressão 24 horas ou 30 dias após o tratamento com Pilocarpina.



RR= rota-rod, TNF= teste de nado forçado, CCE= caixa claro-escuro.

6.9 Processamento de dados e análises estatísticas

Os dados foram plotados no programa GraphPad Prism Version 5.01 para obtenção dos gráficos. Para a realização das análises estatísticas dos dados, foi utilizado o teste ANOVA One-way assumindo um valor de $P \leq 0,05$, seguida do teste post-hoc *Newman Keuls*. Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M).

7.1 Escala de Racine

Todos os animais que receberam PILO (350 mg/Kg, i.p.) morreram até 48 horas após o tratamento. Repetimos os experimentos e encontramos os mesmos resultados. Por conta disso, esse grupo experimental foi excluído das análises comportamentais, a exceção do EEG. Os dados referentes ao comportamento mensurados por meio da Escala de Racine, após a administração das doses de PILO (75 e 150 mg/Kg), encontram-se descritos na Tabela 1. Nenhum dos animais tratados com PILO (75 mg/Kg, i.p.) apresentou Escala de Racine > 3. Entretanto, alguns animais que receberam PILO (150 mg/Kg, i.p.) apresentaram Escala de Racine > 3 ou morreram. Assim, somente os animais que receberam PILO (150 mg/Kg, i.p.) e que apresentaram no máximo grau 3 na Escala de Racine foram submetidos aos testes comportamentais de ansiedade e depressão.

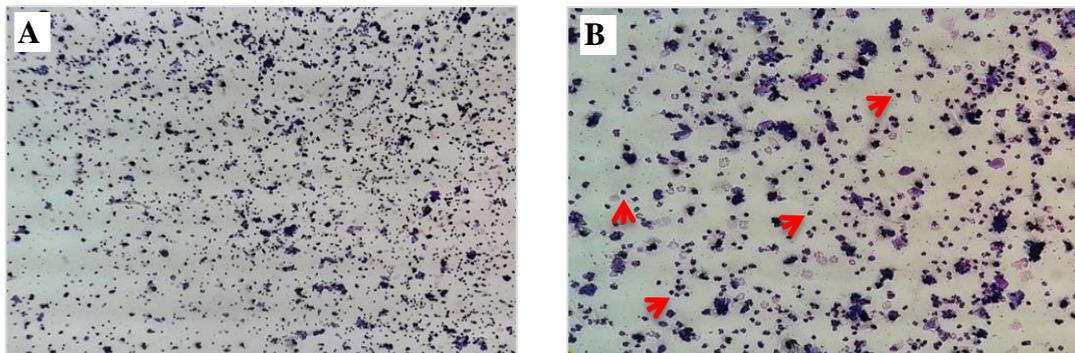
Tabela 1. Análise comportamental realizada por meio da Escala de Racine dos camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com Pilocarpina (PILO; 75 ou 150 mg/Kg, i.p.).

Escala de Racine	% da escala de Racine					
	Machos			Fêmeas		
	Salina	Pilo 75	Pilo 150	Salina	Pilo 75	Pilo 150
Classe 0	-	31% (N= 10)	0% (N= 00)	-	37% (N= 12)	3% (N= 01)
Classe 1	-	3% (N= 01)	2% (N= 01)	-	25% (N= 08)	9% (N= 03)
Classe 2	-	38% (N= 12)	39% (N= 18)	-	13% (N= 04)	41% (N= 13)
Classe 3	-	28% (N= 09)	22% (N= 10)	-	25% (N= 08)	22% (N= 07)
Classe 4	-	0% (N= 00)	6% (N= 03)	-	0% (N= 00)	3% (N= 01)
Classe 5	-	0% (N= 00)	9% (N= 04)	-	0% (N= 00)	3% (N= 01)
Morte	-	0% (N= 00)	18% (N= 10)	-	0% (N= 00)	19% (N= 06)

7.2 Ciclo estral

O esfregaço do lavabo vaginal dos camundongos fêmeas demonstrou uma maior concentração de leucócitos, sugerindo que os animais se encontravam na fase diestro do ciclo estral 24h ou 30 dias após o tratamento com PILO (75 e 150 mg/Kg, i.p.).

Figura 10. Fotomicrografias de esfregaço vaginal de camundongos *Swiss* fêmeas na fase diestro do ciclo estral tratados com Pilocarpina (PILO; 75 ou 150 mg/Kg, i.p.).

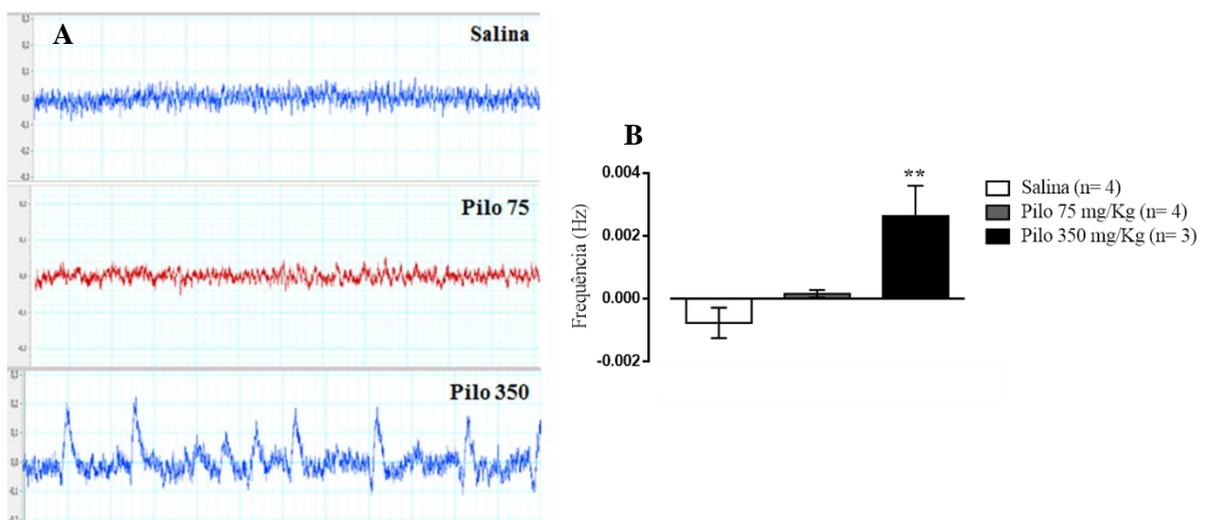


Aumentos de 4x (A) e 10x (B). As setas vermelhas indicam os leucócitos encontrados no esfregaço vaginal. Fonte: Autora, 2016.

7.3 Registros eletroencefalográficos (EEG)

A administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.; Figura 11A) não alterou o registro preliminar do EEG cortical dos camundongos *Swiss* fêmeas. Apenas as classes da escala de Racine maiores do que 3 conseguem causar alguma alteração detectável no EEG do córtex (PHELAN et al., 2015). Estes dados corroboram com a análise do comportamento obtida através da escala de Racine (classe ≤ 3). Por outro lado, os camundongos *Swiss* fêmeas que receberam PILO (350 mg/Kg, i.p.) e obtiveram grau maior do que 3 na escala de Racine apresentaram alteração do EEG cortical como visto na Figura 11B ($F_{2,16943} = 14.91$; $P < 0,005$). A linha de base do EEG dos animais PILO (150 mg/Kg), como também as do registro hipocampal, apresentaram diversos ruídos e por isso, não foram inseridas na análise.

Figura 11. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 350 mg/Kg, i.p.) na atividade elétrica do córtex de camundongos *Swiss* fêmeas.



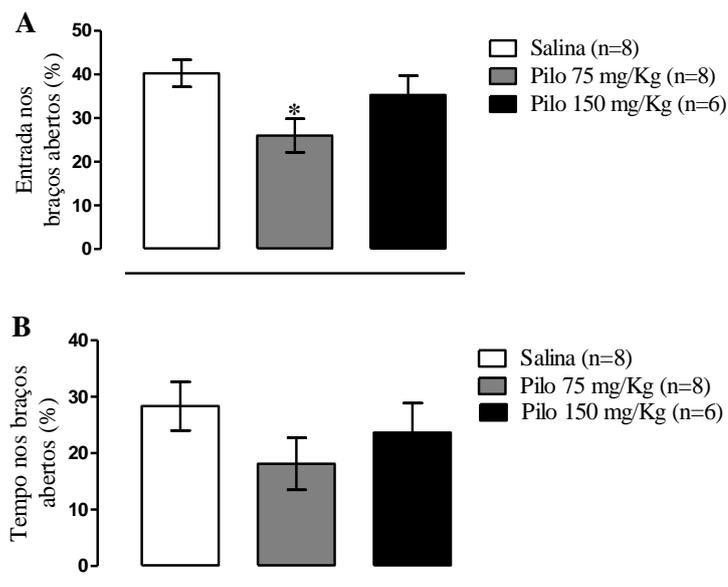
(A) Imagens da análise da frequência máxima do registro; (B) plotagem dos resultados. Resultados expressos em média \pm E.P.M. ** $P < 0,005$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de Newman Keuls).

7.4 Testes de ansiedade

7.4.1 Labirinto em cruz elevado (LCE) – 24 horas

Nos camundongos *Swiss* machos, avaliados 24h após os tratamentos, a administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.) diminuiu a %EBA ($F_{2,19} = 4,08$, $P < 0,05$; Figura 12A) e aumentou o número de pSAP ($F_{2,19} = 6,86$, $P < 0,005$; Tabela 2) de maneira significativa, indicando um efeito do tipo ansiogênico. O número de EBF do LCE não foi alterado por nenhum dos tratamentos ($F_{2,19} = 0,42$, $P = \text{NS}$; Tabela 2), indicando que não houve alteração na atividade locomotora dos animais. Os outros parâmetros temporais avaliados no LCE, como a %TBA ($F_{2,19} = 1,30$, $P = \text{NS}$; Figura 12B) e os demais parâmetros etológicos não foram alterados por nenhum dos tratamentos (Tabela 2).

Figura 12. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* machos.



(A) Porcentagem de entradas e de tempo (B) nos braços abertos do LCE. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

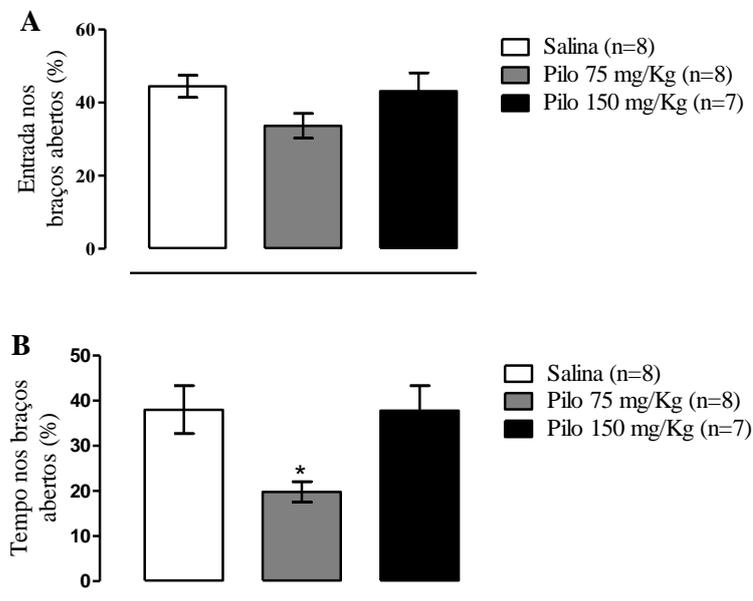
Tabela 2. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* machos.

Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados no LCE			
	EBF	uHD	pSAP	REA
Salina (n=8)	11,63 \pm 0,94	12,75 \pm 4,73	6,63 \pm 2,04	11,50 \pm 1,67
Pilo 75 (n=8)	13,00 \pm 1,12	3,87 \pm 1,53	15,88 \pm 2,04**	11,00 \pm 1,19
Pilo 150 (n=6)	12,17 \pm 1,33	6,50 \pm 4,97	11,33 \pm 0,49	9,67 \pm 1,65

uHD= *head-dipping* não protegido, pSAP= *stretch-attend posture* protegido, REA= *rearings*, CRUZ= cruzamentos. . Resultados expressos em média \pm E.P.M. ** $P < 0,005$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Nos camundongos *Swiss* fêmeas, avaliados 24h após o tratamento, a administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.) reduziu de maneira significativa a %TBA ($F_{2, 20} = 5,48$, $P < 0,05$; Figura 13B) do LCE, quando comparado ao grupo controle, indicando um efeito do tipo ansiogênico. Entretanto, não foi observada diferença estatística no número EBF ($F_{2, 20} = 2,30$, $P = \text{NS}$; Tabela 3), indicando que não houve alteração na atividade locomotora dos animais. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos demais parâmetros analisados do LCE (Figura 13A; Tabela 3).

Figura 13. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.



(A) Porcentagem de entradas e de tempo (B) nos braços abertos do LCE. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Tabela 3. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.

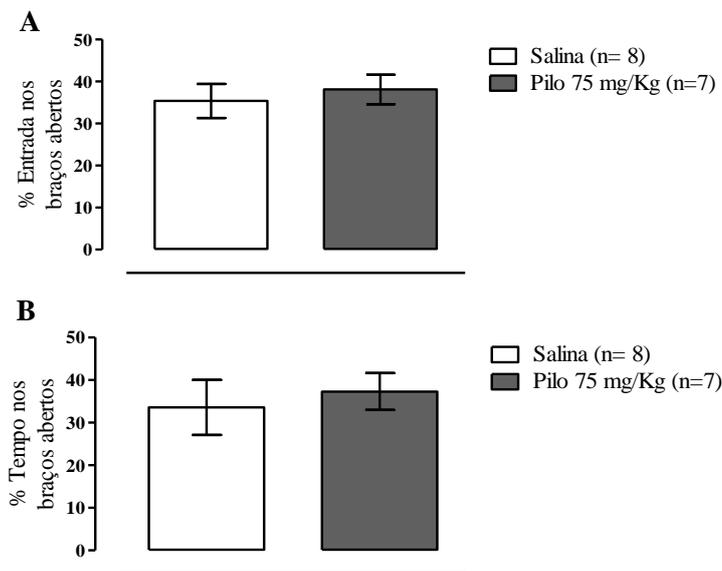
Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados no LCE			
	EBF	uHD	pSAP	REA
Salina (n=8)	11,13 \pm 0,79	10,63 \pm 2,49	5,25 \pm 1,82	6,37 \pm 0,92
Pilo 75 (n=8)	13,25 \pm 1,11	6,75 \pm 1,35	6,25 \pm 1,05	10,38 \pm 1,93
Pilo 150 (n=7)	13,71 \pm 0,75	13,29 \pm 2,56	1,43 \pm 0,61	8,57 \pm 1,52

uHD= *unprotected head-dipping* não protegido, pSAP= *stretch-attend posture* protegido, REA= *rearing*s, CRUZ= cruzamentos. . Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

7.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE) – 30 dias

Nos camundongos *Swiss* machos avaliados 30 dias após os tratamentos, não foram observadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros espaço-temporais [%EBA ($F_{1,13} = 1,53$, $P = \text{NS}$; Figura 14A), %TBA ($F_{1,13} = 2,54$; $P = \text{NS}$; Figura 14B) e EBF ($F_{1,13} = 18,22$, $P = \text{NS}$; Tabela 4)], como também, nos parâmetros etológicos (Tabela 4) avaliados no LCE.

Figura 14. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* machos.



(A) Porcentagem de entradas e de tempo (B) nos braços abertos do LCE. Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

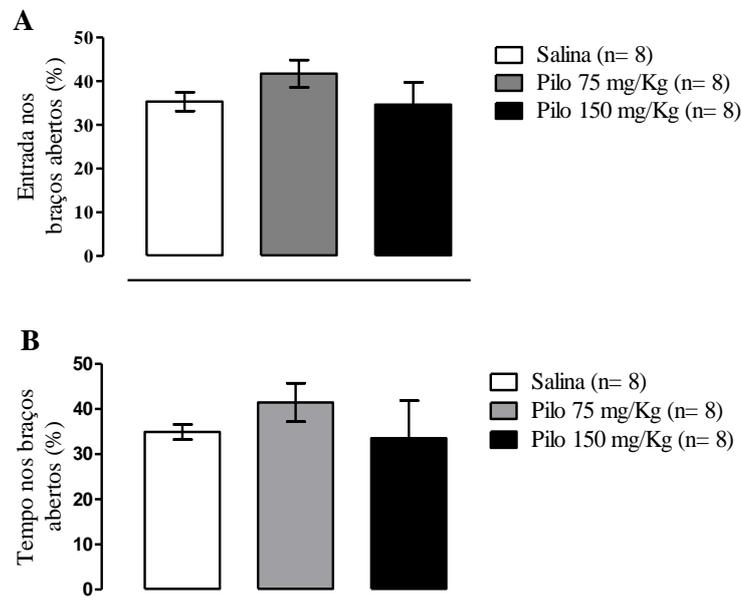
Tabela 4. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* machos.

Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados no LCE			
	EBF	uHD	pSAP	REA
Salina (n=8)	11.13 \pm 1.14	6.50 \pm 1.07	0.25 \pm 0.16	10.00 \pm 2.19
Pilo 75 (n=7)	12.29 \pm 0.28	9.86 \pm 1.56	0.57 \pm 0.37	8.57 \pm 1.43

uHD= head-dipping não protegido, pSAP= stretch-attend posture protegido, REA= rearings, CRUZ= cruzamentos. . Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Não foram observadas diferenças significativas, em camundongos *Swiss* fêmeas, avaliados 30 dias após o tratamento nos parâmetros espaço-temporais [%EBA ($F_{2,21} = 1,12$, $P = \text{NS}$; Figura 15A), %TBA ($F_{2,21} = 0,59$, $P = \text{NS}$; Figura 15B) e EBF ($F_{2,21} = 1,61$, $P = \text{NS}$; Tabela 5)], como também, nos parâmetros etológicos (Tabela 5) avaliados no LCE.

Figura 15. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.



(A) Porcentagem de entradas e de tempo (B) nos braços abertos do LCE. Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Tabela 5. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaciais e etológicos do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.

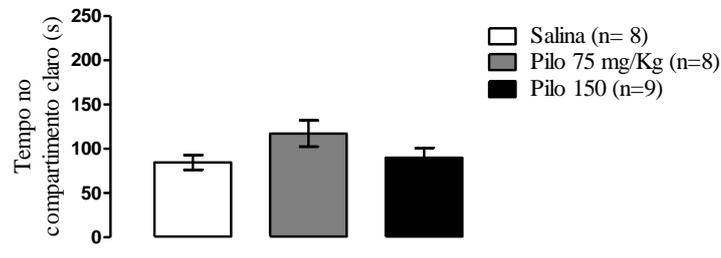
Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados no LCE			
	EBF	uHD	pSAP	REA
Salina (n=8)	11,88 \pm 1,08	7,37 \pm 1,02	2,62 \pm 0,73	11,63 \pm 1,41
Pilo 75 (n=8)	12,88 \pm 0,81	11,50 \pm 1,22	2,37 \pm 0,42	12,50 \pm 1,68
Pilo 150 (n=8)	10,50 \pm 0,91	6,75 \pm 2,23	2,75 \pm 0,65	7,75 \pm 1,36

uHD= head-dipping não protegido, pSAP= stretch-attend posture protegido, REA= rearings, CRUZ= cruzamentos. . Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

7.4.3 Caixa claro-escuro (CCE) – 24 horas

Nos camundongos *Swiss* machos, não foram encontradas diferenças significativas 24h após os tratamentos na CCE nos parâmetros temporais [TCC ($F_{2,22} = 2,19$; $P = \text{NS}$; Figura 16) e LECE ($F_{2,22} = 1,37$, $P = \text{NS}$; Tabela 6) e espaciais [nECE ($F_{2,22} = 1,37$, $P = \text{NS}$; Tabela 6) e CRUZ ($F_{2,22} = 0,12$, $P = \text{NS}$; Tabela 6).

Figura 16. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos *Swiss* machos.



Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

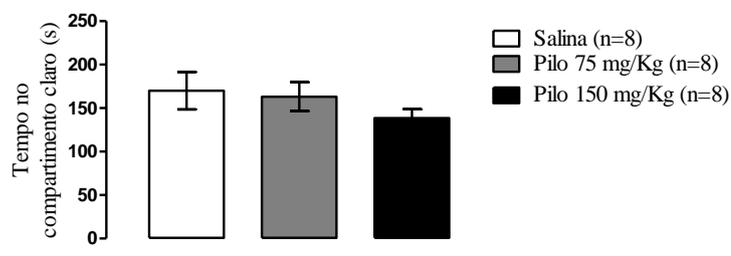
Tabela 6. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos *Swiss* machos.

Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados na CCE		
	LECE	nECE	CRUZ
Salina (n=8)	4,12 \pm 1,11	9,88 \pm 0,95	41,75 \pm 4,87
Pilo 75 (n=8)	24,75 \pm 15,83	8,86 \pm 1,37	43,25 \pm 6,70
Pilo 150 (n=9)	9,67 \pm 2,90	8,00 \pm 0,87	45,89 \pm 6,26

LECE= latência para entrar no compartimento escuro, nECE= número de entradas no compartimento escuro, CRUZ= cruzamentos totais no compartimento claro. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Nos camundongos *Swiss* fêmeas, não foram observadas diferenças significativas 24h após os tratamentos na CCE nos parâmetros temporais [TCC ($F_{2,21} = 0,97$; $P = \text{NS}$; Figura 17) e LECE ($F_{2,21} = 4,73$, $P = \text{NS}$; Tabela 7) e espaciais [nECE ($F_{2,21} = 0,29$, $P = \text{NS}$; Tabela 7) e CRUZ ($F_{2,21} = 2,78$, $P = \text{NS}$; Tabela 7)].

Figura 17. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.



Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Tabela 7. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.

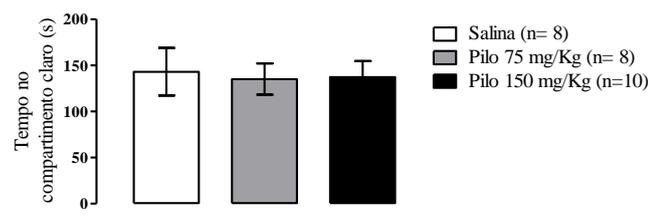
Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados na CCE		
	LECE	nECE	CRUZ
Salina (n=8)	27,50 ± 7,00	8,25 ± 1,22	48,75 ± 6,63
Pilo 75 (n=8)	37,63 ± 7,70	7,50 ± 0,33	34,88 ± 2,39
Pilo 150 (n=8)	10,88 ± 2,68	7,50 ± 0,57	37,63 ± 2,93

LECE= latência para entrar no compartimento escuro, nECE= número de entradas no compartimento escuro, CRUZ= cruzamentos totais no compartimento claro. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

7.4.4 Caixa claro-escuro (CCE) – 30 dias

Não foram encontradas diferenças significativas 30 dias após os tratamentos, nos camundongos *Swiss* machos na CCE, nos parâmetros temporais [TCC ($F_{2,22} = 0,03$; $P = NS$; Figura 18) e LECE ($F_{2,22} = 0,32$, $P = NS$; Tabela 8) e espaciais [nECE ($F_{2,22} = 4,71$, $P = NS$; Tabela 8) e CRUZ ($F_{2,22} = 0,80$, $P = NS$; Tabela 8).

Figura 18. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos *Swiss* machos.



Resultados expressos em média ± E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

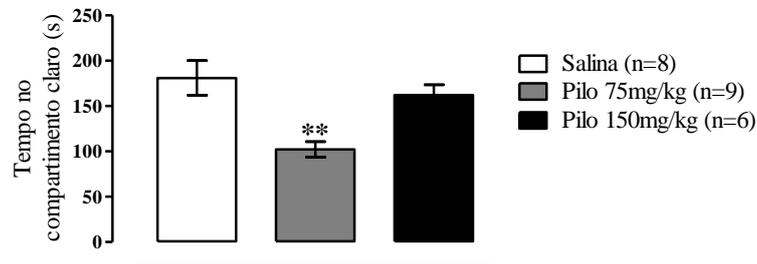
Tabela 8. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE), em camundongos *Swiss* machos.

Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados na CCE		
	LECE	nECE	CRUZ
Salina (n=8)	25,88 ± 16,98	4,38 ± 0,62	28,25 ± 2,96
Pilo 75 (n=8)	27,14 ± 9,68	6,71 ± 0,86	28,71 ± 3,72
Pilo 150 (n=10)	46,40 ± 26,08	7,70 ± 0,84	32,80 ± 2,32

LECE= latência para entrar no compartimento escuro, nECE= número de entradas no compartimento escuro, CRUZ= cruzamentos totais no compartimento claro. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Diferentemente dos resultados de 24h, o tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.) reduziu o TCC ($F_{2,20} = 9,68$, $P < 0,005$; Figura 19) nos camundongos *Swiss* fêmeas, 30 dias após o tratamento, indicando um comportamento do tipo ansiogênico. Não foram encontradas diferenças significativas nos demais parâmetros avaliados [LECE ($F_{2,20} = 3,15$, $P = NS$; Tabela 9), nECE ($F_{2,20} = 0,14$, $P = NS$; Tabela 9) e CRUZ ($F_{2,20} = 2,700$, $P = NS$; Tabela 9) na CCE.

Figura 19. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento no teste da caixa claro-escuro (CCE) em camundongos *Swiss* fêmeas.



Resultados expressos em média \pm E.P.M. **P < 0,005 em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de Newman Keuls).

Tabela 9. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, nos parâmetros espaço-temporais da caixa claro-escuro (CCE), em camundongos *Swiss* fêmeas.

Tratamento (mg/Kg)	Parâmetros avaliados na CCE		
	LECE	nECE	CRUZ
Salina (n=8)	57,00 \pm 22,36	8,75 \pm 1,35	60,25 \pm 5,38
Pilo 75 (n=9)	10,33 \pm 2,51	8,00 \pm 0,87	41,11 \pm 5,21
Pilo 150 (n=6)	24,17 \pm 7,61	8,17 \pm 0,83	49,83 \pm 8,46

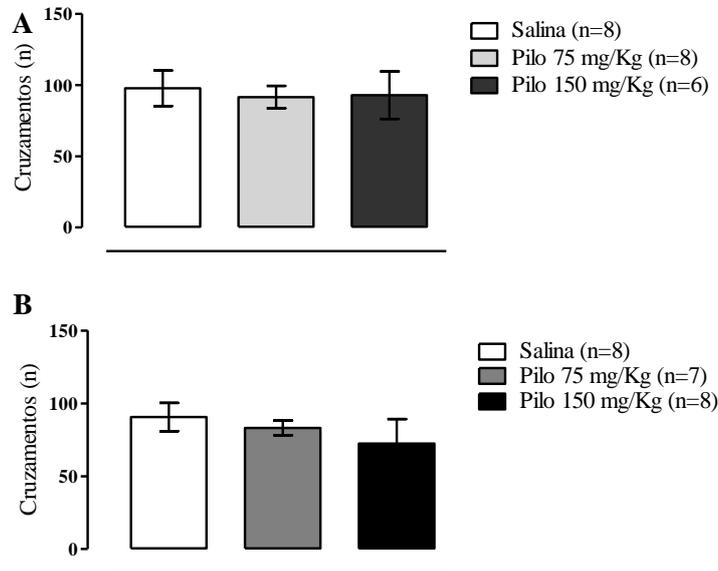
LECE= latência para entrar no compartimento escuro, nECE= número de entradas no compartimento escuro, CRUZ= cruzamentos totais no compartimento claro. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

7.5 Testes de locomoção

7.5.1 Teste do campo aberto (CA) – 24 horas

Não foram observadas diferenças no CA, 24 horas após os tratamentos, para os camundongos *Swiss* machos ($F_{2,19} = 0,08$, $P = \text{NS}$; Figura 20A) e fêmeas ($F_{2,20} = 0,70$, $P = \text{NS}$; Figura 20B), indicando que não houve alteração na atividade locomotora espontânea dos animais.

Figura 20. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste do campo aberto (CA).

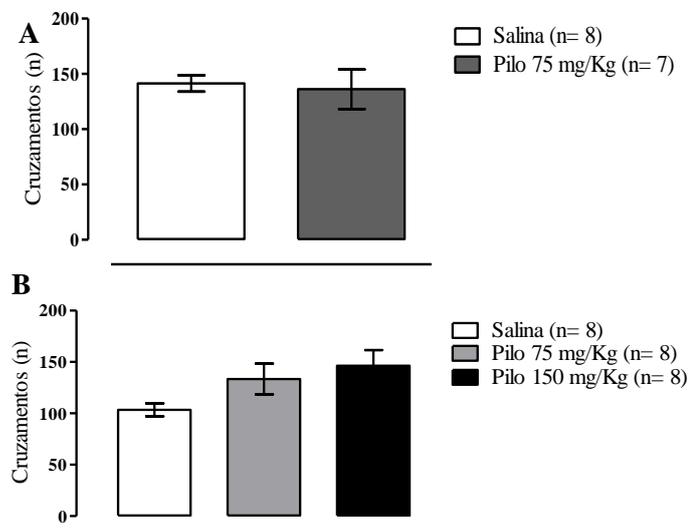


Camundongos *Swiss* machos (A) e fêmeas (B). Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de Newman Keuls).

7.5.2 Teste do campo aberto (CA) – 30 dias

Passados 30 dias dos tratamentos, não encontramos diferenças no CA, para camundongos *Swiss* machos ($F_{1,13} = 5,14$, $P = \text{NS}$; Figura 21A) e fêmeas ($F_{2,21} = 2,95$, $P = \text{NS}$; Figura 21B), indicando que não houve alteração na atividade locomotora espontânea dos animais.

Figura 21. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste do campo aberto (CA).



Camundongos *Swiss* machos (A) e fêmeas (B). Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de Newman Keuls).

7.5.3 Rota-rod (RR) – 24 horas

Não foram observadas diferenças no RR, para camundongos *Swiss* machos ($F_{2,22} = 1,07$; $P = \text{NS}$) e fêmeas ($F_{2,21} = 1,00$; $P = \text{NS}$) 24h após o tratamento, indicando que não houve alteração na atividade locomotora forçada dos animais (Tabela 10).

Tabela 10. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 após o tratamento no teste Rota-rod.

N° de quedas no Rota-rod	N° total de animais por grupo					
	Machos - 24 horas			Fêmeas - 24 horas		
	Salina	Pilo 75	Pilo 150	Salina	Pilo 75	Pilo 150
0 queda	8	7	9	8	8	7
1 quedas	0	0	0	0	0	0
2 quedas	0	0	0	0	0	1
3 quedas	0	1	0	0	0	0

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas. Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

7.5.4 Rota-rod (RR) – 30 dias

Passados 30 dias dos tratamentos, de forma similar aos resultados de 24 h, não foram observadas diferenças no RR para camundongos *Swiss* machos ($F_{2,23} = 0,79$; $P = \text{NS}$) e fêmeas ($F_{2,20} = 0$; $P = \text{NS}$), indicando que não houve alteração na atividade locomotora espontânea dos animais (Tabela 11).

Tabela 11. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento no teste Rota-rod.

N° de quedas no Rota-rod	N° total de animais por grupo					
	Machos – 30 dias			Fêmeas - 30 dias		
	Salina	Pilo 75	Pilo 150	Salina	Pilo 75	Pilo 150
0 queda	8	8	9	8	9	6
1 quedas	0	0	1	0	0	0
2 quedas	0	0	0	0	0	0
3 quedas	0	0	0	0	0	0

Camundongos *Swiss* machos e fêmeas. Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

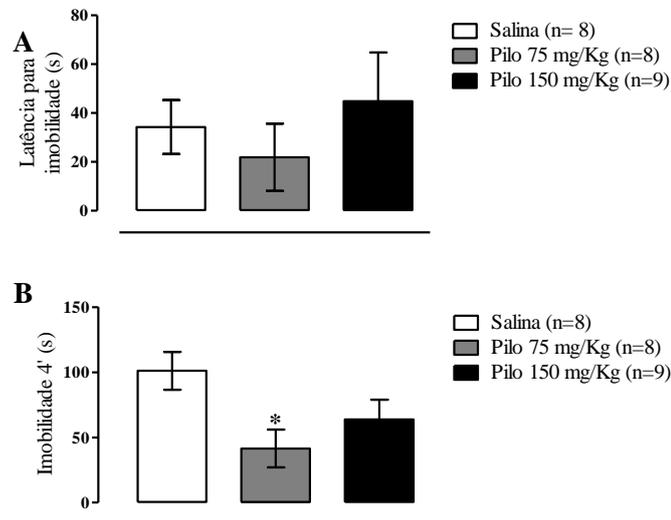
7.6 Teste de depressão

7.6.1 Teste do nado forçado (TNF) – 24 horas

Não foram observadas diferenças 24 h após os tratamentos na latência para imobilidade ($F_{2,22} = 0,53$, $P = \text{NS}$; Figura 22A) no TNF. Entretanto, 24 h após o tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.), houve uma diminuição do tempo de imobilidade nos

camundongos *Swiss* machos ($F_{2, 22} = 3,98$, $P < 0,05$; Figura 22B) em comparação com o grupo controle no TNF.

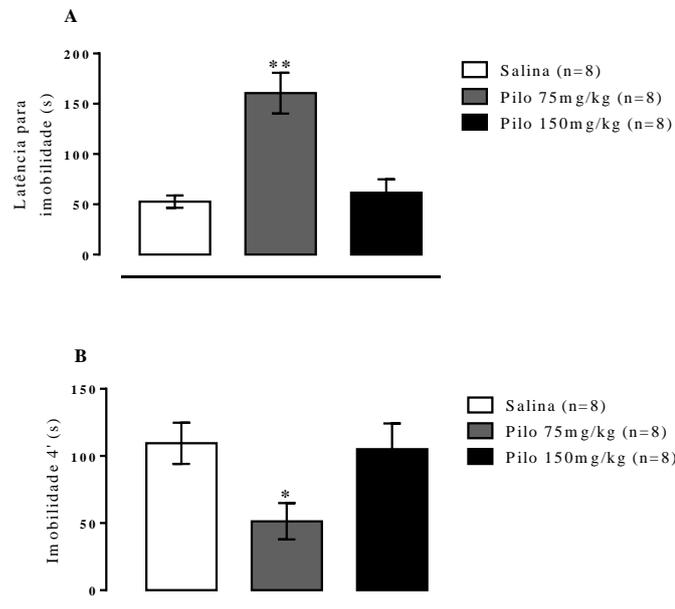
Figura 22. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos *Swiss* machos.



Latência para imobilidade (A) e tempo de imobilidade (B) no TNF. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Observamos que o tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.) aumentou a latência para imobilidade ($F_{2, 27} = 10,69$, $P < 0,005$; Figura 23A) e diminuiu o tempo de imobilidade ($F_{2, 27} = 5,12$, $P < 0,005$; Figura 23B) 24 h após o tratamento no TNF, dos camundongos *Swiss* fêmeas em comparação com o grupo controle.

Figura 23. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 24 horas após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos *Swiss* fêmeas.

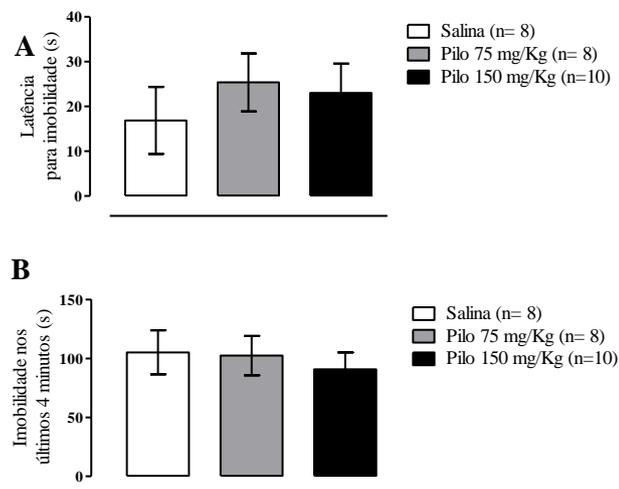


Latência para imobilidade (A) e tempo de imobilidade (B) no TNF. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

7.6.2 Teste do nado forçado (TNF) – 30 dias

Não foram observadas diferenças 30 dias após os tratamentos na latência para imobilidade ($F_{2,22} = 0,38$, $P = \text{NS}$; Figura 24A) e no tempo de imobilidade ($F_{2,22} = 0,23$, $P = \text{NS}$; Figura 24B) nos camundongos *Swiss* machos submetidos ao TNF.

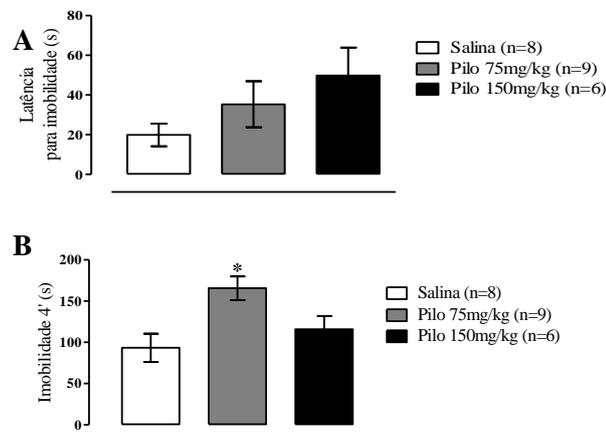
Figura 24. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos *Swiss* machos.



Latência para imobilidade (A) e tempo de imobilidade (B) no TNF. Resultados expressos em média \pm E.P.M. Não significativo em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

Não foram observadas diferenças, 30 dias após os tratamentos, na latência para imobilidade ($F_{2,20} = 1,79$, $P = \text{NS}$; Figura 25A) nos camundongos *Swiss* fêmeas submetidos ao TNF. Entretanto, o tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.) aumentou o tempo de imobilidade de maneira significativa ($F_{2,20} = 5,94$; $P < 0,005$; Figura 25B) em comparação ao grupo controle, nos camundongos *Swiss* fêmeas, quando avaliado 30 dias após o tratamento no TNF (Figura 32).

Figura 25. Efeitos da administração de Pilocarpina (PILO; 75 e 150 mg/Kg, i.p.), 30 dias após o tratamento, no teste de nado forçado (TNF) em camundongos *Swiss* fêmeas.



Latência para imobilidade (A) e tempo de imobilidade (B) no TNF. Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao grupo Salina (ANOVA uma via seguida do teste de *Newman Keuls*).

8.1 Ansiedade

Os testes animais constituem uma importante ferramenta no estudo das bases fisiopatológicas da ansiedade; são usados na pesquisa básica e no desenvolvimento de novas terapias. Por meio destes testes, pode-se ter acesso ao comportamento do animal, *e.g.*, a esquivas, que por sua vez, reflete componentes emocionais mensuráveis encontrados na ansiedade humana (SARTONI et al., 2011).

O LCE tem sido utilizado para testar agentes farmacológicos para o tratamento dos transtornos de ansiedade. De fato, substâncias com efeito do tipo ansiolítico (que reduzem a ansiedade) ou ansiogênico (que aumentam a ansiedade) vem sendo testadas, *e.g.*, agonistas e antagonistas dos receptores benzodiazepínicos (LISTER, 1987; VARTY et al., 2002), agonistas e antagonistas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ adrenérgicos (HANDLEY; MITHANI, 1984); agonistas 5-HT_{1A} e SSRIs (VARTY et al., 2002), como também, o efeito de outras substâncias naturais e sintéticas (GWENDOLYN; TYE, 2015; WALF; FRYE, 2007).

No LCE, os principais índices para avaliação da ansiedade são o número de entradas nos braços abertos (% EBA) e o tempo gasto nos braços abertos (% TBA); ambos expressos em percentagem (RODGERS et al., 1997; ZARRINDAST et al., 2011). A exploração do animal nos braços abertos reflete a preferência do animal por áreas protegidas (braços fechados) e a aversão inata em explorar ambientes novos e iluminados, ambientes considerados mais vulneráveis a ameaças ambientais (PELLOW et al., 1985; WALF; FRYE, 2007; GWENDOLYN; TYE, 2015).

Nossos resultados mostraram que a administração da dose intermediária de PILO (75 mg/Kg, i.p.) diminuiu a %EBA e a %TBA no LCE, 24 horas após o tratamento, em camundongos *Swiss* machos e fêmeas, respectivamente, indicando um comportamento tipo ansiogênico. Acredita-se que este resultado não está associado a um prejuízo motor, uma vez que o número de EBF do LCE e o número de cruzamentos no CA não foram alterados; parâmetros bem validados para avaliar a atividade locomotora do animal (WALF; FRYE, 2007). Nossos resultados estendem os encontrados por Duarte et al. (2010), que após a administração de doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de PILO (75 e 150 mg/Kg, i.p.) em ratos Wistar observaram o mesmo padrão comportamental até 3 meses após o tratamento. E apesar de termos encontrado este efeito em apenas uma única dose intermediária de PILO, um possível aumento na transmissão colinérgica no hipocampo pode justificar o comportamento do tipo ansiogênico encontrado (DUARTE et al., 2010).

Duarte et al. (2010) observaram que após o bloqueio temporário da transmissão neural na fímbria-fórnix, principal via que faz ligação, *e.g.*, entre o hipocampo e o septo, como também, entre o hipocampo e o diencéfalo, o perfil ansiogênico encontrado previamente foi reduzido (aumentou a %TBA e diminuiu o pSAP) um mês após o tratamento com PILO no LCE. Além disso, o mesmo perfil (reversão do comportamento ansiogênico) foi encontrado após o bloqueio da região pós-comissural do fórnix. Esses achados sugerem um suposto papel das vias neurais entre o hipocampo e o hipotálamo no perfil ansiogênico de longa duração, encontrado nos ratos Wistar (DUARTE et al., 2010).

A circuitaria septohipocampal corresponde uma das vias mais importantes, nos transtornos de ansiedade. O septo e hipocampo estão intimamente interligados via fibras septo-hipocampais e fibras hipocampais-septais que se seguem via fórnix. O septo projeta ao hipocampo fibras colinérgicas e GABAérgicas e por sua vez, o hipocampo projeta fibras GABAérgicas e glutamatérgicas de volta ao septo (MENESES, 2011; RUIVO TELES-GRILLO; MELLOR, 2013). Uma vez as fibras colinérgicas chegando ao hipocampo, a liberação de ACh resulta na ativação dos receptores mAChRs e nAChRs (GRAY e McNAUGHTON, 2000; RUIVO TELES-GRILLO; MELLOR, 2013). Além disso, a formação hipocampal está intimamente ligada a diversas regiões cerebrais via fórnix (SAUNDERS; AGGLETON et al., 2007; AGGLETON et al., 2010).

O fórnix constitui um importante trato de entrada e saída de inúmeras conexões do hipocampo com diversas áreas subcorticais e corticais no cérebro (SAUNDERS, AGGLETON, 2007). Da região pré-comissural do fórnix partem fibras, *e.g.*, para o córtex pré-frontal (CPF), o núcleo accumbens e o septo, enquanto que da região pós-comissural seguem fibras, *e.g.*, para o hipotálamo e núcleos mamilonares (AGGLETON et al., 2010). Lesões na região do fórnix já mostraram alterações nos comportamentos do animal relacionados ao medo condicionado e memória (PHILLIPS; LEDOUX, 1995). A interpretação dos efeitos provenientes de lesões no fórnix não é de fácil compreensão, visto que, desta região, partem inúmeras conexões para diferentes vias cerebrais envolvidas em diversas funções (SAUNDERS et al., 2007).

Entretanto, a administração de um inibidor da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por catalisar a hidrólise de ACh e que ao ser inibida promove o aumento de ACh na fenda sináptica, na amígdala basolateral (BLA) de ratos, mostrou um comportamento do tipo ansiolítico no LCE (ZARRINDAST et al, 2011). Acredita-se que os receptores muscarínicos (M₁, M₂ e M₃) encontrados na AMG (MASH; POTTER, 1986; LEVEY et al., 1994), possam afetar a resposta do animal às situações que representam uma possível ameaça. Parece que o efeito tipo ansiolítico do inibidor da AChE na AMG seja mediado via ativação

dos receptores dopaminérgicos (D1 e D2), uma vez que, o sistema dopaminérgico tem um grande papel na modulação da ansiedade (DE LA MORA et al., 2010; ZARRINDAST et al., 2011).

A PILO atua como agonista do receptor colinérgico muscarínico M1 (HAMILTON et al., 1997). A circuitaria colinérgica tem seus eferentes distribuídos na região cortical, do hipocampo e da AMG de forma equivalente a circuitaria monoaminérgica (GRAY, MCNAUGHTON, 2000). Os receptores M1 são predominantemente pós-sinápticos e amplamente expressos no córtex, hipocampo e estriado, onde podem mediar a ação da PILO, as funções cognitivas, como também, a plasticidade sináptica (LEVEY, 1993; BYMASTER; FELDER, 2002).

As estruturas da AMG, do hipocampo ventral (HPCv) e do córtex pré-frontal medial (CPFm) formam um circuito interligado, no qual, cada estrutura desempenha um importante papel na ansiedade (PADILLA-COREANO et al., 2016). Os transtornos de ansiedade surgem de perturbações na sincronia existente entre estas estruturas, interrompendo todo o equilíbrio do sistema, que funciona para direcionar o fluxo de estímulos detectados pelo nosso cérebro das condições ambientais externas. Uma vez o equilíbrio sendo quebrado, a interpretação de um estímulo externo passa a ser processada de uma maneira diferente, condicionando respostas emocionais e comportamentos inapropriados observadas nos transtornos de ansiedade, assim como, em outros transtornos psíquicos (GWENDOLYN; TYE, 2015).

A ativação dessas estruturas mediante a um estímulo aversivo pode levar a mudanças nos ritmos oscilatórios, *e.g.*, o ritmo theta hipocampal; controlado por *inputs* colinérgicos e serotoninérgicos (GRAY, MCNAUGHTON, 2000). Por exemplo, um aumento da sincronia na frequência de theta foi encontrado entre o CPFm e o HPCv de animais expostos ao LCE. Assim sendo, parece que essas oscilações, entre o CPFm e o HPCv, podem mediar a comunicação durante a exposição do animal a ambientes considerados ameaçadores (ADHIKARI et al., 2010). Além disso, Duarte et al. (2013) demonstraram que o ritmo theta hipocampal foi aumentado após a administração de PILO (150 e 350 mg/Kg) em ratos que apresentaram um comportamento do tipo ansiogênico.

Embora não existam estudos na literatura retratando os efeitos nos comportamentos relacionados à ansiedade após administração de doses intermediárias de PILO em camundongos *Swiss*, estudos realizados após a indução do SE (PILO; 300 mg/Kg, *i.p.*) em camundongos e ratos, tem mostrado um comportamento tipo ansioso em diferentes testes comportamentais, *e.g.*, LCE e CCE (LOPES et al., 2016; OTSUKA et al., 2016).

Otsuka et al. (2016), retrataram as alterações comportamentais dos animais após a indução do SE de diferentes durações; 1,5 h e 4,5 h. Os autores observaram que o comportamento do tipo ansiogênico em camundongos persistiram de 3 a 4 dias até quase um ano após a indução do SE (duração de 4,5 h). Associada a estas alterações comportamentais foi observada morte de células neuronais na região CA1 do hipocampo acompanhada por uma redução na quantidade de várias proteínas sinápticas nesta região. Em contrapartida, ao comportamento tipo ansioso identificado após a indução do SE (duração de 1,5 h) não foi acompanhado de morte neuronal no hipocampo (OTSUKA et al., 2016).

Observamos um aumento no número de pSAP no LCE, 24 horas após o tratamento (PILO; 75 mg/Kg, i.p.), indicando um comportamento tipo ansiogênico em camundongos *Swiss* machos. Nossos resultados corroboram com o encontrado por Duarte et al. (2013), após administração de uma dose subconvulsivante de PILO (150 mg/Kg, i.p.) em ratos Wistar. O SAP constitui um comportamento natural característico de roedores, no qual, o animal faz uma avaliação de risco devido a um conflito de aproximação-esquiva, *e.g.*, de um ambiente novo ou predador (GREWAL et al., 1997; VAN DER POEL, 1979). Durante situações de conflito-exploração, o SAP pode ser utilizado como um parâmetro válido para avaliação da ansiedade, uma vez que, animais tratados com compostos ansiolíticos mostraram uma redução desse parâmetro etológico (KAESERMANN, 1986; WALF; FRYE, 2007).

Acredita-se que os núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) tenham uma importante função nos comportamentos de avaliação de risco e medo. Ratos quando foram expostos a um predador natural, apresentaram um aumento na expressão de c-fos nas regiões hipotalâmicas; dos núcleos anteriores, do núcleo ventromedial e dos PMd (CANTERAS, 2002). Essas áreas parecem se conectar com um sistema distinto que se liga a AMG, ao núcleo leito da estria terminal (NLST) e septo lateral, e envia projeções a matéria cinzenta periaquedutal (BLANCHARD et al., 2003). Blanchard et al. (2003) ao lesionar os PMd em ratos, observaram que quando expostos ao odor do predador, as respostas de medo, *e.g.*, o freezing estava abolida e o *stretch approach*, encontrava-se aumentada.

Nossos resultados demonstraram que o comportamento do tipo ansiogênico não foi encontrado após 30 dias da administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.) no LCE em camundongos *Swiss* machos e fêmeas. Lopes et al. (2016), também observaram um padrão comportamental diferente após ratos Wistar que receberam PILO (300 mg/Kg, i.p.) serem avaliados nos períodos denominados de maturação (9° dia após o tratamento) e crônico (57° dia após o tratamento). Na fase de maturação os animais apresentaram um comportamento tipo

ansio gênico, enquanto, no período crônico, não foram observadas alterações comportamentais no LCE.

De forma similar ao LCE, a CCE constitui um teste bem validado para analisar os níveis de ansiedade tendo como base a aversão inata do roedor de locais altamente iluminados. Quando os roedores são inseridos no aparato, podem explorar livremente os dois compartimentos (claro ou escuro). O modelo gera, no animal, um conflito inerente entre explorar ou esquivar-se do ambiente iluminado (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; GRIEBEL; HOLMES, 2013). Diversos estudos têm demonstrado um comportamento tipo ansiolítico do animal na CCE após a administração de substâncias agonistas de diferentes receptores, *e.g.*, GABA_A (CRAWLEY et al., 1981), 5-HT_{1A} (CRAWLEY et al., 1981) e 5-HT_{1B} (METZENAUER et al., 1992).

Embora o LCE e a CCE sejam testes similares utilizados para avaliar o estado de ansiedade do animal, os resultados entre os testes nem sempre são consistentes, sugerindo que estes não avaliam o mesmo fenômeno psicobiológico na ansiedade (TAKAO; MIYAKAWA, 2006). Acredita-se que pelo fato da emoção não ser unidirecional, vários eixos independentes podem ser acessados por uma série de testes envolvendo diferentes estímulos, *e.g.*, um ambiente novo, aberto ou iluminado (RAMOS, 2008).

Ao contrário do LCE, não encontramos diferença no comportamento dos animais (machos e fêmeas) 24h após o tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.) na CCE. Uma das hipóteses sugere que o LCE e a CCE avaliam diferentes aspectos comportamentais na ansiedade, *e.g.*, o comportamento ansioso no espaço aberto (no LCE) e a ansiedade no compartimento claro, na CCE (TAKAO; MIYAKAWA, 2006).

Estes resultados se estenderam para os camundongos *Swiss* machos após 30 dias do tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.). Resultados semelhantes foram encontrados por Müller et al (2009) que ao utilizarem camundongos C57BL/6 machos que não desenvolveram SE (PILO; 100 mg/Kg, i.p.), não identificaram mudanças no tempo de permanência do animal no compartimento claro da CCE, 15-18 semanas após o tratamento e concomitantemente, não foram encontrados danos ou perda neuronal no hipocampo nas células piramidais de CA1, CA3 e no *hillus* do giro dentado (MÜLLHER et al., 2009).

Entretanto, ao contrário dos camundongos *Swiss* machos, passados 30 dias após o tratamento com PILO (75 mg/Kg, i.p.), observamos que as fêmeas diminuíram o tempo de permanência no compartimento claro da CCE, indicando um comportamento tipo ansio gênico. Uma maior prevalência da ansiedade no gênero feminino é consistente em diversos estudos (KACZKURKIN et al., 2016; McLEAN et al., 2011). Kaczurkin et al.

(2016) encontram um padrão divergente do fluxo sanguíneo cerebral entre indivíduos do gênero masculino e feminino com ansiedade traço; um maior fluxo sanguíneo foi encontrado em indivíduos femininos nas regiões que controlam as emoções *e.g.*, a AMG.

Um modelo animal de um transtorno neurológico ou psiquiátrico pode ser obtido por meio de um teste comportamental com medidas validadas que pretendem medir e determinar as alterações, *e.g.* fisiológicas, que acontecem durante a exposição do animal ao teste. Esta estratégia possibilita um forte racional para investigação posterior na compreensão da base neurobiológica nos transtornos neurológicos (ENNACEUR; CHAZOT, 2016).

Os dados obtidos neste trabalho, estendem aqueles encontrados com ratos Wistar, por Duarte et al. (2010, 2013), ao sugerir a administração de doses subconvulsivantes e/ou intermediárias de PILO como um modelo traço de ansiedade. Um modelo traço de ansiedade pode mimetizar em laboratório a ansiedade traço humana que corresponde a uma tendência persistente e duradora de um indivíduo em demonstrar uma resposta de ansiedade aumentada. Com mais estudos e a consolidação de um novo modelo, poderíamos contribuir no fechamento de lacunas importantes sobre a circuitaria neural da ansiedade, aspecto de extrema importância no desenvolvimento de um melhor tratamento na ansiedade patológica.

8.2 Depressão

Embora a ansiedade e a depressão sejam transtornos distintos, a maioria dos indivíduos acometidos por transtornos depressivos, em algum momento da vida, manifesta algum tipo de transtorno de ansiedade. Não existe nenhuma evidência na literatura que possa comprovar a associação de causa-efeito entre os transtornos, entretanto, sabe-se que existe uma correlação positiva na ocorrência entre estas desordens (ADAA, 2016; GORMAN, 1996).

A compreensão dos mecanismos patofisiológicos envolvidos na depressão não está claramente definida, entretanto, a hipótese melhor estabelecida sugere que a depressão esteja relacionada a uma deficiência no conteúdo ou função das seguintes monoaminas: a 5-HT, a NE e DA das áreas cortical e límbica, também envolvidas nos transtornos de ansiedade (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Qualquer alteração neuronal a nível morfológico ou celular nesta circuitaria representa danos significantes na plasticidade neuronal com consequências diretas na percepção do animal em se adaptar a estímulos ambientais, comportamentais e farmacológicos (DUMAN, 2004).

A DM, o transtorno de pânico, o GAD e o transtorno de ansiedade social, são os transtornos mais prevalentes na área da psiquiatria (VAN TOL et al., 2010). Muitos sintomas clínicos são compartilhados entre a ansiedade e depressão, *e.g.*, inquietação e agitação (KREITLER, 2017). Além disso, disfunções no eixo HPA e em vias neurobiológicas, *e.g.*, a via serotoninérgica e a via noradrenérgica já foram encontradas, fortalecendo ainda mais a associação destas patologias (GORMAN, 1996). Por isso, decidimos estender nosso estudo para avaliar o comportamento dos animais submetidos ao teste de depressão; o TNF.

O TNF avalia o comportamento do animal submetido a um ambiente inescapável, representado no teste por um cilindro com água. Ao assumirmos a premissa que o animal mais imóvel no teste representa um animal mais depressivo, o teste torna-se uma importante ferramenta na descoberta de novas substâncias antidepressivas. Ou seja, a administração de uma substância antidepressiva já padronizada, anterior ao teste, leva ao animal a se mover mais, diminuindo o tempo total de imobilidade do mesmo (CAN et al., 2012).

Em geral, apenas os últimos 4 minutos do TNF são avaliados. Isso se deve ao fato de que a maioria dos animais permanece muito ativo nos primeiros minutos do teste. Neste caso, se fosse contabilizado a imobilidade do animal desde os minutos iniciais, o potencial efeito antidepressivo de uma determinada substância poderia ser mascarado durante os dois primeiros minutos (CAN et al., 2012).

Nossos primeiros resultados, após 24 horas da administração da PILO (75 mg/kg, *i.p.*), indicaram um comportamento do tipo antidepressivo em camundongos machos e fêmeas, sem alteração na atividade locomotora no RR. Os resultados do TNF foram contraditórios ao que esperávamos, repetimos os testes para comprovação da sua veracidade. Apesar de termos utilizado doses intermediárias de PILO, trabalhos que utilizaram doses convulsivantes encontraram o mesmo padrão comportamental no TNF em camundongos epiléticos (GROTICKE et al., 2007; LOPES et al., 2016; MÜLLER et al., 2009). Os autores observaram que os animais epiléticos continuavam a nadar e tentavam escapar do cilindro em comparação ao grupo controle. Entretanto, nenhum dos trabalhos credencia a redução do tempo de imobilidade do animal a um possível efeito antidepressivo da PILO (GROTICKE et al., 2007; LOPES et al., 2016; MÜLLER et al., 2009). Ao contrário desses resultados, após a administração de agonista muscarínico, a fisiostigmina, ratos submetidos ao TNF permaneceram por mais tempo imóveis (HASEY; HANIN, 1991).

Independente da dose de PILO, acredita-se que o comportamento “anormal” do animal, encontrado no TNF, resulta de algum problema no entendimento contextual ou processamento da situação do teste. Ou seja, enquanto o animal controle aprende rapidamente

com a situação de estresse inescapável ao desenvolver a imobilidade, o animal que recebeu PILO parece não entender que aquela situação é inescapável e assim, continua tentando escapar (GROTICKE et al., 2007; LOPES et al., 2016; MÜLLER et al., 2009). Em humanos, aqueles que sofrem dos transtornos de humor apresentam disfunções na tomada de decisão por atribuírem valores diferentes a opção disponível (PAULUS, 2007). Alterações no entendimento contextual são encontradas frequentemente nos transtornos psiquiátricos humanos, *e.g.*, psicose e ataques de pânico (MÜLLER et al., 2009).

A via colinérgica central tem um importante papel nos transtornos afetivos; a via encontra-se hiperativada na depressão. Considera-se que um dos determinantes para os transtornos afetivos é o desequilíbrio entre a atividade noradrenérgica e colinérgica cerebral. Esta hipótese apoia-se no fato de que antidepressivos tricíclicos possuem propriedades anticolinérgicas centrais. De fato, a reserpina, substância que depleta o conteúdo de noradrenalina e possui propriedades colinomiméticas (que mimetizam a ação da ACh), induz a depressão (JANOWSKY, 1972).

Estudos com pacientes depressivos, utilizando antagonistas muscarínicos, *e.g.*, a escopolamina (antagonista do receptor M1), mostraram uma diminuição significativa dos sintomas de depressão (FUREY; DREVENTS, 2006). Além disso, análises de neuroimagem de cérebros de indivíduos depressivos, identificaram um aumento do nível do precursor de ACh em até 15% (STEINGARD et al., 2000). Embora os dados mostrem uma relação entre a ACh com os quadros depressivos, não se sabe ao certo quais populações específicas de neurônios colinérgicos podem impactar na patogênese da depressão (FUREY; DREVENTS, 2006; HAN et al., 2017).

A homeostasia das funções cerebrais responsáveis pelo comportamento, o humor e a cognição são intrinsicamente interligadas com os processos de transdução de sinais sinápticos; composto por diversos componentes, *e.g.*, neurotransmissores, enzimas efetoras, mensageiros secundários e fatores neurotróficos (FISAR et al., 2012; KAPCZINSKI, 2004). Considera-se que a transdução de sinais, mediada por receptores acoplados à proteína G, e a ativação da cascata de segundos mensageiros, estão alterados durante a depressão (FISAR et al., 2012). Uma vez a proteína G ativada, vias de sinalização tornam-se ativas e vários segundos mensageiros podem ser gerados, *e.g.*, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), o inositol trifosfato (IP3), o diacilglicerol (DAP) e o cálcio (Ca^{2+}). Como os receptores colinérgicos muscarínicos (M1-M5) são receptores acoplados a proteína G, podem ativar diversas vias de sinalização. Por sua vez, estas vias interagem em conjunto e formam um sistema intracelular

complexo envolvido na regulação da neuroplasticidade e resposta ao estresse (FISAR et al., 2012).

Passados 30 dias da administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.) não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos animais machos no TNF. Entretanto, as fêmeas apresentaram comportamento do tipo depressivo, ou seja, permaneceram por mais tempo imóveis. Parece-nos que após 30 dias do tratamento, existe alguma alteração neural nas fêmeas, uma vez que, também encontramos alterações na CCE, mas não no LCE. De forma similar a ansiedade, a depressão é considerada uma patologia com maior prevalência e persistência em indivíduos do gênero feminino do que no gênero masculino (WHO, 2017).

Acredita-se que a diferença existente entre os gêneros pode ser influenciada fortemente por características biológicas femininas, incluindo variações hormonais, *e.g.*, dos hormônios esteroidais (FERNÁNDEZ-GUASTI et al., 2012). Em um estudo mais recente, Bundy et al. (2017) encontraram 198 genes hipocámpais que são diferentemente expressos em camundongos machos e fêmeas com diferentes idades. Uma das diferenças foi a expressão da proteína HSPs (do inglês *Heat shock proteins*), bem designadas como proteínas do estresse (FEDER; HOFMANN, 1999) que mostrou uma expressão estável nas fêmeas ao longo da idade, enquanto que nos machos, foram progressivamente reguladas.

9 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.) produziu um efeito do tipo ansiogênico a curto prazo em camundongos *Swiss* machos e fêmeas no LCE, e, a longo prazo, apenas em camundongos fêmeas na CCE. Além disso, as análises preliminares do EEG, demonstrou que a PILO (75 mg/Kg, i.p.) não alterou a linha de base do registro. Em conjunto, nossos dados corroboram com os encontrados por Duarte et al. (2010) e sugerem um importante papel da via colinérgica central nos transtornos de ansiedade e como um possível modelo de ansiedade.

Nossos resultados também demonstraram que a administração de PILO (75 mg/Kg, i.p.) produziu um efeito do tipo antidepressivo a curto prazo em camundongos *Swiss* machos e fêmeas no TNF. Após 30 dias, o efeito do tipo depressivo foi encontrado apenas em camundongos *Swiss* fêmeas. Esses dados sugerem que pode existir uma mudança na circuitaria neural envolvida com a depressão, a curto e a longo prazo, após a administração de PILO tornando as fêmeas mais susceptíveis aos efeitos do tipo ansiogênico e depressivo da PILO em doses intermediárias. O tratamento com PILO (150 mg/Kg, i.p.) não alterou nenhum dos parâmetros avaliados nos diferentes testes comportamentais de ansiedade, de locomoção e de depressão.

Novos estudos devem ser realizados para a identificação de quais vias colinérgicas centrais estariam atreladas aos resultados encontrados aqui (para ansiedade e depressão). Com isso, lacunas importantes poderiam ser fechadas a respeito da circuitaria neural envolvida nos transtornos de ansiedade e depressão. Sendo assim, poderíamos futuramente contribuir na melhoria nos tratamentos farmacológicos disponíveis e na condição de vida dos acometidos por ambos os transtornos.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, 65, 257-269. 2010.
- AGGLETON, J.P.A. et al. Hippocampal–anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. **European Journal of Neuroscience**, 31, 2292-2307. 2010.
- ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. **The British Journal of Psychiatry**, 171, 524-529. 1997.
- ANDRADE, L.H. et al., Mental disorders in megacities: findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. **PLoS ONE**, 7, e31879. 2012.
- ANDREASEN, J.T.; OLSEN, G.M.; WIBORG, O.; REDROBE, J.P. Antidepressant-like effects of nicotinic acetylcholine receptor antagonists, but not agonists, in the mouse forced swim and mouse tail suspension tests. **Journal Psychopharmacology**, 23, 797-804. 2008.
- ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D.Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 23, 233-242. 2001.
- ANXIETY AND DEPRESSION ASSOCIATION OF AMERICA (AADA). **Depression**, 2016. Disponível em: <https://www.adaa.org/understanding-anxiety/depression>.L Acessado em: 20 Jan 2017.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 5 ed. Manual. 2013. 976 p.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Clinical Research**, 17, 328-335. 2015.
- BERNIK, M. A.; SOARES, M.B DE BARROS, SOARES, C.N. Benzodiazepínicos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 48, 131-137. 1990.
- BLAIR, R.D. Temporal Lobe Epilepsy Semiology. **Epilepsy Research and Treatment**, 2012, 10 pgs, 2012.
- BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE B.; DHONNCHADHA B.N.; HASCÔET M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental e Clinical Pharmacology** 21,567-574. 2007.
- BOURO, A.; HAUT, S. Medical comorbidities in the treatment of epilepsy. **Epilepsy Behavior**, 4 (Suppl2), 2-12. 2003.
- BUNDY, J.L.; VIED, C.; NOWAKOSWSKI, R.S. Sex differences in the molecular signature of the developing mouse hippocampus. **BCM Genomics**, 18, 237, 2017.

- BYMASTER, F.P.; FELDER, C.C. Role of the cholinergic muscarinic system in bipolar disorder and related mechanism of action of antipsychotic agents. **Molecular Psychiatry**,7 (Suppl 1), 57-63. 2002.
- CAMPOS, A.; FOGAC, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 35, 101-111. 2013.
- CAN, A. et al. The mouse forced swim test. **Journal of Visualized Experiments**, 59, 1-5. 2012.
- CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**,71, 481-491. 2002.
- CHISHOLM, D. et al. Scaling-up treatment of depression and anxiety: a global return on investment analysis. **The Lancet Psychiatry**, 3, 415-424. 2016.
- CLIFFORD, D.B.; OLNEY, J.W.; MANIOTS, A.; COLLINS, R.C.; ZORUMSKI, C.F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, 23, 953-968. 1987.
- COSTALL B.; JONES, B.J.; KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J.; TOMKINS, D.M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 32,777–785. 1989.
- CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 13, 167-70.1980.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 15, 695– 699.1981.
- CRYAN, J.F.; MARKOU, A. e LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences** , 23, 238–245. 2002.
- CURRAN, H.V.; SCHIFANO, F.; LADER, M. Models of memory dysfunction ? A comparison of the effects of scopolamine and lorazepam on memory, psychomotor performance and mood. **Psychopharmacology**, 103, 83-90. 1991.
- DE LA MORA, M.P. et al. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. **Progress in Neurobiology**, 90, 198-216. 2010.
- DELL'OSSO, B.; BUOLI, M.; BALDWIN, D.S. Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. **Human Psychopharmacol**, 25, 17-29. 2010.
- DUARTE, F.S.; GAVIOLI E.C.; DUZZIONI M., HOELLER, A.A, CANTERAS N.S.; DE LIMA, T.C. Short- and long-term anxiogenic effects induced by a single injection of

subconvulsant doses of pilocarpine in rats: investigation of the putative role of hippocampal pathways **Psychopharmacology (Berlin)**, 212, 653-661. 2010.

DUARTE, F.S.; DUZZIONI, M.; HOELLER, A.A.; et al. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety?. **Psychopharmacology (Berlin)**, 227, 209-219. 2013.

DUMAN, R.S. Depression: A case of neuronal life and death?. **Biological Psychiatry**, 56, 140-145. 2004.

DUMAN, C.H. Models of depression. **Vitamins and Hormones**, 82, 1-21. 2010.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association (Baltim)**, 45, 208-209. 1957.

ENNACEUR, A.; CHAZOT, P.L. Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. **Pharmacology Research & Perspectives**, 4, 1-37. 2016.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, 61, 243-282. 1999.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A. et al. Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. **Hormone and Metabolic Research**, 44, 607-618. 2012.

FILE, S.E.; WARDILL, A.G. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacologia**, 44,47-51. 1975.

FILE, S.E. Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behaviour. **Neuropsychobiology** 13, 55–62. 1985.

FISAR, Z.; HROUDOVÁ, J.; RABOCH, J. Neurotransmission in mood disorders. In: Juruena, M.F. **Clinical, research and treatment approaches to affective disorders**.1 ed. Croatia: Teodora Smiljanic, 2012. 47 p.

FUREY, M.L.; DREVETS, W.C. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Archives of general psychiatry**, 63, 1121-1129. 2006.

GARDNER, C.R. Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. **Journal Pharmacology Methods**, 14, 181-187. 1985.

GEORGE, M.K. et al. Vagus nerve stimulation (VNS): utility in neuropsychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, 6, 73-83. 2003.

GORMAN, J.M. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. **Depression and Anxiety**, 4, 160-168. 1996.

GRAEFF, F.G. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. (Ed.). **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 135-178, 1999.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, 163, 467-476. 2002.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. The Neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system. 2nd ed. Oxford University Press: Oxford, 2000. 443 p.

GREWAL, S.S. et al. Behavioural and pharmacological characterisation of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats. **Psychopharmacology (Berlin)**, 1, 29-38. 1997.

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

GRIFFIN, C.E. et al. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. **The Ochsner Journal**, 13, 214-223. 2013.

GRÖTICKE, I.; HOFFMAN, K.; LÖSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Experimental Neurology**, 207, 329-349. 2007.

GWENDOLYN G.C.; KAY, M.T. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, 8, 1394-1404. 2015.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: defecation and urination measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, 18, 385-403. 1934.

HAN, S. et al. Down-regulation of cholinergic signaling in the habenula induces anhedonia-like behavior. **Scientific Reports**, 7, 1-13. 2017.

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**, 327, 1-5. 1984.

HAMILTON, S.E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94, 13311-13316. 1997.

HASEY, G.; HANIN, I. The cholinergic-adrenergic hypothesis of depression reexamined using clonidine, metoprolol, and physostigmine in an animal model. **Biological Psychiatry**, 29, 127-138. 1991.

HASCÖET, M.; BOURIN, M. A new approach to the light/dark test procedure in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 60, 645-653. 1998.

JONES, W. H. S.; WITHINGTON. **Hippocrates**. Works of Hippocrates. Vol. 1-5. Trans. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1923-1931.

HOELLER, A.A.; COSTA, A.P.; BICCA, M.A. The Role of Hippocampal NMDA Receptors in long-term emotional responses following muscarinic receptor activation. **PLoS One**, 11, e0147293. 2016.

HUNT, C.; ISSAKIDIS, C.; ANDREWS. DSM-IV generalized anxiety disorder in the Australian National Survey of mental health and well-being. **Psychological Medicine**, 32, 649-659. 2002.

HORWITZ, A.V.; WAKEFIELD, J.C.; LORENZO-LUACES, L. History of depression. **Oxford University Press: Oxford Handbooks Online**, 2016. 1-24 p.

JONES, J.E. et al. Clinical Assessment of Axis I Psychiatric Morbidity in Chronic Epilepsy A multicenter investigation. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinics Neurosciences**, 17, 172-179. 2005.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 26, 189-201. 2004.

KACZKURKIN, A.N. et al. Elevated amygdala perfusion mediates developmental sex differences in trait anxiety. **Biological Psychiatry**, 15, 775-785. 2016.

KAESERMANN, H.P. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. **Psychopharmacology**, 89, 31-37. 1986

KAPCZINSKI, F.; FREY, B.N.; ZANNATO, V. Fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar: o que mudou nos últimos 10 anos?. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 26, 17-21. 2004.

KELLNER, C.H. et al. ECT in Treatment-Resistant Depression. **American Journal Psychiatry**, 169, 1238-1244. 2012.

KESSLER, R.C. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, 21, 169-184. 2012.

KREITLER, S. The meaning profiles of anxiety and depression: similarities and differences in two age groups. **Cognition & Emotion**, 25, 1-15. 2017.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, 455, 894-902. 2008.

LEITE, J.P. et al. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 23, 681-683. 1990.

- LENT, R. **Cem bilhões de neurônios ? Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2010. 747 p.
- LEVEY, A.I. et al. Localization of muscarinic m3 receptor protein and m3 receptor binding in rat brain. **Neuroscience**, 63, 207-221. 1994.
- LEVEY, A.I. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. **Life Science**, 52, 441-448. 1993.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, 92, 180-5. 1987.
- LOPES, M., W. et al. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, 55, 92-100. 2016.
- LORENZINI, A.C.; BUCHERELLI, C.; GIACHETTI A. Passive and active avoidance behavior in the light-dark box test. **Physiology Behavior**, 32, 687-689. 1984
- JANOWSKY, D.S.; EL-YOUSEF, M.K.; DAVIS, J.M.; SEKERKE, H.J. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. **Lancet**, 2, 632-635. 1972.
- MARTIN, J.L.R. et al. Repetitive transcranialmagnetic stimulation for the treatment of depression. **Journal of Psychiatry**, 182, 480-491. 2003.
- MASH, D.C.; POTTER, L.T. Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, 19, 551-564. 1986.
- MIDDELDORP, C.M. et al. The co-morbidity of anxiety and depression in the perspective of genetic epidemiology. A review of twin and family studies. **Psychological Medicine**, 35, 611-624. 2005.
- McKINNEY, W. T.; BUNNEY, W. E. Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. **Archives General Psychiatry**, 21, 240-248. 1969.
- McLEAN, C.P. et al. Gender Differences in Anxiety Disorders: Prevalence, Course of Illness, Comorbidity and Burden of Illness. **Journal Psychiatry Research**, 45, 1027-1035. 2011.
- MERALI, Z.; LEVAC, C.; ANISMAN, H. Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. **Biological Psychiatry**, 54, 552-565. 2003.
- MENESES, M.S. Neuroanatomia aplicada. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 351 p.
- METZENAUER, P. et al. Anxiolytic-like actions of anpirtoline in a mouse light-dark aversion paradigm. **Neuroreport**, 3, 527-529. 1992.

- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, 48, 254–260. 1955.
- MONTGOMERY, S.A.; JUDGE, R. Treatment of depression with associated anxiety: comparisons of ticyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. **Acta Psychiatrica Scand**, 101 (Suppl. 403;: 9-16. 2000).
- MÜLLER, C.J.; GRÖTICKE, I.; BANKSTAHL, M.; LÖSCHER, W. Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. **Experimental Neurology**, 219, 284–297. 2009.
- NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH (NIMH). **Depression Basics**, 2016. Disponível em: <https://www.nimh.nih.gov/health/publications/depression/index.shtml#pub2>. Acessado em: 20 Jan 2017.
- NEMENTH, C. L. et al. Not all depression is created equal: sex interacts with disease to precipitate depression. **Biology of Sex Differences**, 4, 1-10. 2013.
- NITECKA, L.; BEN-ARI, Y. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. **The Journal of Comparative Neurology**, 226, 45-55. 1987.
- NOLEN-HOEKSEMA, S. Gender differences in depression. **American Psychological Society**, 10, 173-176. 2001.
- OTSUKA, S. et al. Dual mechanisms of rapid expression of anxiety-related behavior in pilocarpine-treated epileptic mice. **Epilepsy Research**, 123, 55-67. 2016.
- PAULUS, M.P. Decision-making dysfunctions in psychiatry. **Science**, 318, 602-606. 2007.
- PAXINOS G.; FRANKLIN K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 3rd . San Diego: Academic Press, 256p, 2008.
- PADILLA-COREANO, N. et al. Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. **Neuron**, 89, 857-866. 2016.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, E.S.; BRILEY, M. Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14,149-167. 1985.
- PHELAN, K.D. et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale. **Epilepsy Research**, 117, 90-96. 2015.
- PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Lesions of the fornix but not the entorhinal or perirhinal cortex interfere with contextual fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, 15, 5308-5315. 1995.
- PICHOT, P. Panic: attack and disorder. History of the word and concepts. **Encephale**, 5, 3-8. 1996.

- PINTO, W.B.V.; KO, G.M. Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, 1, 202-212. 2012.
- PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal Pharmacology**, 47, 379–381. 1978.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**, 229,327–336. 1977.
- POWELL, T.R.; SCHALKWYK, L.C. Depression-related behavioral tests. **Current Protocols in Mouse Biology**, 2, 119-127, 2012.
- POWERS, R.E. The pharmacological management of depression in the adult person with mental retardation and developmental disabilities. **Bureau of Geriatric Psychiatry**, 55, 1-9. 2005.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, 463, 3 – 33. 2003.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. Trends in **Pharmacological Sciences**, 29,493-498. 2008.
- ROBINS, L.N.; REGIER, D.N. psychiatric disorders in America: the epidemiologic catchment area study. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, 17, 34-36. 1992.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30, 289-304. 1997.
- ROTZINGER, S.; LOVEJOY, D.A.; TAN, L.A. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. **Peptides**, 31, 736-756. 2010.
- ROUSE, S.T. et al. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. **Life Sciences**, 64, 501-509. 1999.
- RUIVO TELES-GRILO, L.M.; MELLOR, J.R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, 5, 1-15. 2013.
- SAUNDERS, R.C.; AGGLETON, J.P. Origin and Topography of Fibers Contributing to the Fornix in Macaque Monkeys. **Hippocampus**, 17, 396-411. 2007.
- SARTONI, S.B.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N. The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. **Future Neurology**, 6, 531-571. 2011.
- SHEPHERD, J.K. et al. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berlin)**, 116, 56-64. 1994.

SPIELBERGER, C. D. Anxiety: current trends in theory and research. **New York: Academic Press**, 1972.

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

SIMIAND, J.; KEANE, P.E.; MORRE, M. The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. **Psychopharmacology (Berlin)**, 84, 48-53. 1984.

SMYTHE, J.M.; MURPHY, D.; BHATNAGAR, S. et al. Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54, 57-64. 1996.

STEINGARD, R.J. et al. Increased orbitofrontal cortex levels of choline in depressed adolescents as detected by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. **Biological Psychiatry**, 48, 1053-1061. 2000.

SWINKELS, M. **Psychiatric Comorbidity in Epilepsy**. Rotterdam: Grafische Communicatie. 2005. 153 p.

TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Light/dark Transition Test for Mice. **Journal of Visualized Experiments**, 1, 1-3, 2006.

TILLER, J.W.G. Depression and anxiety. *The Medical Journal of Australia*, Suppl 4, 28-31. 2012.

TOFOLI, S.M.C. Early life stress, HPA axis, and depression. **Psychology & Neuroscience**, 4, 229-243. 2011.

TRINCAVELLI, M.L.; DA POZZO, E.; DANIELE, S.; MARTIN, C. The GABA-BZR complex as target for the development of anxiolytic drugs. **Current Topics Medicinal Chemistry**, 12, 254-269. 2012.

TURSKI, W.A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, 9, 315-35. 1983.

TURSKI, W.A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, 32, 237-253. 1984.

TYE, K.M. Neural Circuit Reprogramming: A New Paradigm for Treating Neuropsychiatric Disease?. **Neuron**, 6, 1259-1261. 2014.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. **Darwin correspondence project. Emotion Experiment**. 2017. Disponível em: <https://www.darwinproject.ac.uk/commentary/human-nature/expressionemotions/emotion-experiment> Acessado em: 11 Mar 2017.

VAN DER POEL, A.M. A note on 'stretched attention', a behavioural element indicative of an approach-avoidance conflict in rats. **Animal behaviour**, 27, 447-450. 1979.

VAN DER ZEE, E.A.; LUITEN, P.G.M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress in Neurobiology**, 58, 409-471. 1999.

VAN GAALEN, M. M.; STECKLER, T. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. **Behavioural Brain Research**, 115, 95-106. 2000.

VAN TOL, M.J. et al. Regional brain volume in depression and anxiety disorders. **Arch General Psychiatry**, 10, 1002-1011. 2010.

VARTY, B.,G. et al. The gerbil elevated plus-maze I: behavioral characterization and pharmacological validation. **Neuropsychopharmacology**, 27, 357-370. 2002.

VIANA, M.B. Freud e Darwin: ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo. **Natureza Humana**. 12, 163-196, 2010.

VENTER, J.C. et al. Evolution of neurotransmitter receptor systems. **Progress in Neurobiology**, 30, 105-169. 1988.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocol.**, 2, 322-328. 2007.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: A Critical Review. **Psychological Bulletin**, 482-504. 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The global burden of disease**. Switzerland: WHO Library Cataloguing. 2004. 150 p.

WHO. **Suicide data. SDG Target 3.4, Indicator 3.4.2 Suicide mortality rate**. 2012. Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/whs2016_AnnexA_Suicide.pdf?ua=1&ua=1. Acessado em: 20 fev 2017.

WHO. **Mental Health Action Plan 2013-2020**. Geneva: WHO Document Production Services. 2013. 47p.

WHO. **Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/en/>. Acesso em: 20 jan 2017.

WHO. **Gender and women's mental health**. 2017. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/prevention/genderwomen/en/. Acesso em: 20 mar 2017.

WHO. **World Health Statistics, 2017**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255336/1/9789241565486-eng.pdf?ua=1>. Acessado em: 10 dez 2017.

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

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **European Journal Pharmacology**, 504, 207-211. 2004.

ZARRINDAST, M.R.; SROUSHI, A.; BANANEJ, M.; et al. Involvement of the dopaminergic receptors of the rat basolateral amygdala in anxiolytic-like effects of the cholinergic system. **European Journal Pharmacology**, 672,106-112. 2011.

ANEXO 1. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), N° 17/2014.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO N° 17/2014

TÍTULO: Avaliação dos efeitos a curto e em longo prazo do tratamento agudo de doses subconvulsivantes de pilocarpina no comportamento de camundongos *Swiss* machos e fêmeas submetidos a testes de ansiedade e locomoção.

RESPONSÁVEL: Profº. Drº. Marcelo Duzzioni

OBJETIVO: Fortalecer e estender a validação da administração única de doses subconvulsivantes de pilocarpina, agonista não seletivo de receptores muscarínicos da acetilcolina, como um teste de traço de ansiedade em roedores.

Objetivos específicos:

1. Avaliação comportamental 24h após a administração intraperitoneal de doses subconvulsivantes de pilocarpina em camundongos machos e fêmeas submetidos a testes de ansiedade e locomoção;
2. Avaliação comportamental um mês após a administração intraperitoneal de doses subconvulsivantes de pilocarpina em camundongos machos e fêmeas submetidos a testes de ansiedade e locomoção;
3. Avaliação da atividade elétrica do córtex e hipocampo de camundongos machos e fêmeas 24 h após a administração intraperitoneal de doses subconvulsivantes de pilocarpina;
4. Avaliação da atividade elétrica do córtex e hipocampo de camundongos machos e fêmeas um mês após a administração intraperitoneal de doses subconvulsivantes de pilocarpina.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 01/06/2014 a 31/12/2015

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo heterogênico	<i>Swiss</i>	448

ANEXO 2. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Nº 22/2015.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 22/2015

TÍTULO: Avaliação a curto e em longo prazo dos efeitos da administração única de doses subconvulsivantes de pilocarpina em testes de depressão, nos níveis sorológicos de corticosterona e na morfologia cardíaca de camundongos Swiss machos e fêmeas.

RESPONSÁVEL: Marcelo Duzzioni

OBJETIVO: Avaliar os efeitos comportamentais a curto e em longo prazo dos efeitos da administração única de doses subconvulsivantes de pilocarpina, agonista não seletivo de receptores muscarínicos da acetilcolina, em camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos a testes de depressão, bem como avaliar parâmetros bioquímicos e alterações na morfologia cardíaca.

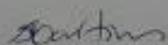
SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 17.08.2015 a 17.08.2017

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo heterogênico	Swiss	250 machos e 250 fêmeas

Maceió, 14 de agosto de 2015.


 Prof.ª Dra. Silvana Ayres Martins
 Coordenadora da CEUA/UFAL
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
SIAPE 1120658