

Alexandre Ademar Hoeller

**UM NOVO MODELO PARA O ESTUDO DE ANSIEDADE:
INVESTIGAÇÃO DAS RESPOSTAS EMOCIONAIS EM RATOS
TRATADOS COM PILOCARPINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Florianópolis
2013

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

Hoeller, Alexandre Ademar

Um novo modelo para o estudo de ansiedade : Investigação das respostas emocionais em ratos tratados com pilocarpina / Alexandre Ademar Hoeller ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima - Florianópolis, SC, 2013. 153 p.

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

Inclui referências

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

À Família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Thereza C. M. de Lima por confiar e ter me aceitado como pupilo nos últimos anos. Agradeço pela orientação (acadêmica e pessoal), pela amizade, compreensão e, acima de tudo, por frequentemente me estimular a novos desafios na vida.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC, sempre solícitos e que estiveram, de alguma forma, envolvidos na minha formação acadêmica.

Aos membros da banca de qualificação e tese Dr. Marcus Lira Brandão, Dr. Roger Walz, Dr. Leandro José Bertoglio, Dra. Cilene Lino de Oliveira, Dr. Geison Souza Izídio, Dr. Giles Alexander Rae e Dr. Antonio de Pádua Carobrez pelas contribuições fundamentais para a construção e finalização dessa tese.

Aos amigos de longa data que me acompanham desde os primórdios nessa complexa incursão ao ambiente acadêmico Dr. Filipe S. Duarte, Dr. Marcelo Duzzioni e Me. Tiago Souza Santos.

Aos amigos e colegas (antigos e novos) do Laboratório de Neurofarmacologia (LabThe) Alanny, Ana Paula, Andressa, Claudini, Cristiane, Evelyn, Filipe, Gilliard, Júlia, Leandro, Leonardo, Lígia, Maíra, Marcelo, Nayana, Pablinny, Rebeca, Renata, Vagner, pela ajuda e momentos de confraternização (cafezinhos, bolos, chocoleites, salgados sem frango, ...).

Ao Professor Dr. Zuner Assis Bortolotto e à sua família. Agradeço por ter aceitado me orientar durante o estágio sanduíche na *University of Bristol* (Bristol, Inglaterra), pela excelente orientação, pela amizade e companheirismo durante uma fase de nossas vidas que nunca será esquecida. Muito obrigado!

Aos demais colegas do *MRC Centre for Synaptic Plasticity e Henry Wellcome Laboratories for Integrative Neuroscience and Endocrinology* da *University of Bristol* Arturas, Francesca, Grace, James, Lydia, Marion, Minos e aos professores Dr. Graham L. Collingridge e Dr. Stafford L. Lightman. Obrigado pela ajuda, paciência e pelo convívio.

À minha família, especialmente, meus pais Arliones e Bete, meu irmão Junior, minha esposa Fernanda e meus sogros Joy e Sandra. Obrigado pelo incentivo, compreensão e apoio durante todos esses anos. Apesar da distância física, as lembranças dos bons momentos que passamos sempre estão comigo no dia a dia.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro durante o doutorado e estágio sanduíche imprescindível para a realização deste trabalho.

Inventors and geniuses have almost always been looked on as no better than fools at the beginning of their career, and very frequently at the end of it also.

(Fyodor Dostoyevsky, *The Idiot*, 1869)

RESUMO

Objetivos: A influência de crises epilépticas nas respostas emocionais observadas em humanos e animais tem sido extensivamente investigada, mas poucos trabalhos têm evidenciado o perfil comportamental de animais que não convulsionam apesar de terem sido tratados com agentes convulsivantes. Com intuito de melhor caracterizar os mecanismos envolvidos nos efeitos induzidos pela pilocarpina (PILO) – um agonista não seletivo dos receptores muscarínicos -, ratos *Wistar* adultos machos foram tratados (20 a 350 mg/kg, i.p.) e aqueles que não desenvolveram *status epilepticus* ou crises recorrentes espontâneas foram avaliados 24 h ou 1 mês após o tratamento no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, o envolvimento dos receptores GABA-A (diazepam, DZP, i.p., 1 mg/kg; pentilenotetrazol, PTZ, i.p., 15 mg/kg) e NMDA (memantina, i.p., 4 mg/kg) foram investigados para tentar esclarecer os mecanismos neurais implicados nos efeitos da PILO. Registros de eletroencefalograma (EEG) hipocampal, dosagens bioquímicas de corticosterona plasmática (CORT), ACTH e expressão de receptores NMDA foram realizados 24 h ou 1 mês após o tratamento.

Resultados: A injeção de PILO (150 ou 350 mg/kg) promoveu efeitos ansiogênicos em ratos avaliados no teste do LCE, com uma diminuição do tempo gasto e número de entradas nos braços abertos do labirinto em comparação aos ratos controle. A injeção de DZP bloqueou os efeitos ansiogênicos observados em ratos tratados com PILO e avaliados 24 h ou 1 mês após o tratamento, aumentou o tempo e número de entradas nos braços abertos do labirinto e a incidência de comportamentos relacionados à avaliação de risco. Por outro lado, a injeção de PTZ não alterou o perfil comportamental de ratos tratados com PILO e avaliados no labirinto, sugerindo a promoção de uma resposta ansiogênica máxima observada nesse grupo. O tratamento com pilocarpina (150 e 350 mg/kg) aumentou o ritmo teta hipocampal embora apenas a dose mais elevada de PILO (350 mg/kg) tenha promovido descargas do tipo pontanda durante registros de EEG, mostrando que os efeitos tipo-ansiogênicos observados com a dose de 150 mg/kg não são dependentes de atividade ictal. Além disso, tanto os níveis plasmáticos de CORT quanto ACTH aumentaram 24 h após a injeção de PILO embora apenas os níveis de CORT permaneceram elevados 1 mês após o tratamento, o que pode sugerir o envolvimento de fatores epigenéticos (*e.g.* alterações na expressão de receptores de glicocorticoides em estruturas límbicas relacionadas à função do eixo HPA). O pré-tratamento com memantina bloqueou os efeitos ansiogênicos observados em ratos tratados com

PILO e avaliados 24 h ou 1 mês após o tratamento, havendo aumento do tempo e número de entradas nos braços abertos do labirinto. Os níveis de expressão dos receptores NMDAR1 e R2B no hipocampo foram diminuídos 24 h ou 1 mês (mas não a subunidade R2B) após a injeção de PILO.

Conclusões: Nossos dados sugerem que a estimulação central de receptores colinérgicos muscarínicos, através de uma única injeção sistêmica de pilocarpina (em doses subconvulsivas), é capaz de induzir comportamentos defensivos relacionados à ansiedade durante um longo período em ratos, efeitos estes não dependentes de atividades epiléticas no hipocampo. Os efeitos ansiogênicos parecem estar associados a um aumento da atividade teta hipocampal, que pode desempenhar um papel codificador na regulação do sistema septo-hipocampal sobre o eixo HPA, que está ativado (conforme indicado pela maior liberação de glicocorticoides). Além disso, observamos uma diminuição da expressão de receptores do tipo NMDA no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina, sugerindo que alterações na atividade neuronal hipocampal inibitória sobre o eixo HPA podem ser responsáveis por mediar as respostas ansiogênicas observadas após o tratamento com pilocarpina. Nossos achados são compatíveis com os preceitos da teoria de Gray e McNaughton (1983), que enfatiza o importante papel modulatório da circuitaria septo-hipocampal na regulação dos estados de medo e ansiedade através da ativação de aferências colinérgicas sobre estruturas límbicas. Levando em consideração as limitações no campo translacional de doenças psiquiátricas para modelos animais, os resultados aqui expostos podem auxiliar no refinamento de pesquisas pré-clínicas relacionadas aos transtornos de ansiedade, proporcionando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas respostas de ansiedade e estresse em roedores.

Palavras-chave: Pilocarpina. Ansiedade. Comportamento. Ritmo teta. Receptores GABA-A. Receptores NMDA.

ABSTRACT

Rationale: There is extensive evidence indicating the influence of the cholinergic system on emotional responses observed in human and animals, but so far few studies are focusing on the behavioral profile of animals that do not present seizures despite being treated with convulsant agents.

Objectives: In order to better characterize and to shed light on the neural mechanisms mediating the effects induced by pilocarpine (PILO) – a non-selective muscarinic receptor agonist -, adult male Wistar rats were treated (20 to 350 mg/kg, i.p.) and those that did not develop status epilepticus or spontaneous recurrent seizures were evaluated 24 h or 1 month later in the elevated plus maze (EPM) test. Additionally, GABA-A (diazepam, DZP, i.p., 1 mg/kg; pentylenetetrazole, PTZ, i.p., 15 mg/kg) and NMDA (memantine, i.p., 4 mg/kg) receptors involvement were investigated to clarify the neural mechanisms implicated in PILO's effect. Hippocampal electroencephalographic recordings (EEG), biochemical dosages of plasmatic corticosterone (CORT), ACTH hormones and NMDA receptor expression were performed shortly (24 h) or long-after (1 month) the treatment.

Results: The injection of PILO (150 or 350 mg/kg) promoted anxiogenic-like effects in rats evaluated in the EPM test, with a decrease in the time spent and number of entries on the open arms of the maze in comparison to control rats. Acute DZP injection blocked the anxiogenic-like effects observed in PILO-treated rats evaluated 24 h or 1 month after the treatment, increasing the time spent and number of entries on the open arms of the maze and risk-assessment behaviors incidence. On the other hand, the acute injection of PTZ did not alter the behavioral profile of PILO-treated rats evaluated in the EPM test, suggesting the promotion of a maximal anxiogenic response observed in this group. Only the highest dose of PILO (350 mg/kg) evoked spike-wave discharges during EEG recordings. Hippocampal theta rhythm was increased in the hippocampus, reflecting the cholinergic influence of the septo-hipocampal system over the control of anxiety. Additionally, both CORT and ACTH levels were impressively increased 24 h after the injection of PILO whereas only CORT remains elevated 1 month after the treatment, which may suggest the involvement of epigenetic factors (e.g. glucocorticoid receptors regulation) of limbic structures linked to the HPA axis function. Memantine pre-injection blocked the anxiogenic-like effects observed in PILO-treated rats evaluated 24 h or 1 month after the treatment, increasing the time spent and number of entries on

the open arms of the maze. Moreover, the expression of both hippocampal NMDAR1 and R2B receptors were decreased 24 h or 1 month (but not R2B subunit) after the injection of PILO.

Conclusions: Our findings reveal that a single systemic subconvulsant dose of pilocarpine promotes long-lasting effects on the emotional responses of rats, reflected by an increase of anxiogenic-like responses (sensitive to GABA-A and NMDA signaling), hippocampal theta rhythm activity and anxiety/stress hormonal mediators in rats evaluated 24 h or 1 month after the treatment. Increased levels of CORT may reflect the involvement of a decreased NMDA-dependent neuronal excitability (possibly elicited by muscarinic receptor activation) which diminishes the hippocampal inhibitory transmission over the axis, leading consequently to an anxious profile of the evaluated rats. Altogether, these results give support to our previous findings and establish a new research strategy which could be useful as a new tool to model long-term anxiety in rats besides highlighting the muscarinic system as a target to future translational studies in this field.

Keywords: *Pilocarpine. Anxiety. Behavior. Theta rhythm. GABA-A receptors. NMDA receptors.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Histórico do desenvolvimento das drogas ansiolíticas.....	27
Figura 2 – Vista sagital do encéfalo de rato enfatizando as projeções colinérgicas.....	29
Figura 3 – Classificação e função dos receptores colinérgicos muscarínicos.....	30
Figura 4 – Diagrama esquemático mostrando a via dependente de Ca ²⁺ mediando a depressão induzida pela ativação do subtipo M1 dos receptores muscarínicos na função do receptor NMDA em células piramidais da região CA3 do hipocampo.....	31
Figura 5 – Esquema do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).....	34
Figura 6 – Prevalência de comorbidades em pacientes epiléticos.....	35
Figura 7 – Efeitos fisiológicos desencadeados pela administração sistêmica de pilocarpina.....	37
Figura 8 – Incidência anual de trabalhos publicados em diferentes periódicos utilizando os termos de busca na língua inglesa “anxiety”, “epilepsy” e “anxiety and epilepsy”, disponíveis na base de dados PubMed.....	40
Figura 9 – Labirinto em cruz elevado.....	44
Figura 10 – Caixa de condicionamento ao contexto.....	46
Figura 11 – Cirurgia estereotáxica para o implante dos eletrodos.....	47
Figura 12 – Ambiente experimental para registro do EEG.....	48
Figura 13 – Câmara de registro extracelular.....	49
Figura 14 – Esquema representativo do protocolo de tratamento adotado ao longo do estudo.....	54
Figura 15 – Efeitos da administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina em ratos avaliados 1 mês após o tratamento no labirinto em cruz elevado.....	58
Figura 16 – Efeitos de doses ansiogênicas de pilocarpina sobre a atividade eletroencefalográfica de ratos	60
Figura 17 – Atividade teta hipocampal observada 1 mês após a administração de doses ansiogênicas de pilocarpina.....	61
Figura 18 – Avaliação de parâmetros comportamentais clássicos de ratos pré-tratados com uma dose ansiogênica de pilocarpina e posteriormente tratados com uma droga-padrão ansiolítica ou ansiogênica.....	63
Figura 19 – Avaliação de parâmetros comportamentais etológicos de ratos pré-tratados com uma dose ansiogênica de pilocarpina e posteriormente tratados com uma droga-padrão ansiolítica ou ansiogênica.....	64
Figura 20 – Atividade eletroencefalográfica (EEG) após a administração de diazepam ou pentilenotetrazol em ratos registrados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina.....	67

Figura 21 – Incidência de atividade teta hipocampal após a administração de diazepam ou pentilenotetrazol em ratos registrados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina.....	68
Figura 22 – Comportamento de ratos submetidos ao teste de condicionamento aversivo contextual após a administração de pilocarpina.....	70
Figura 23 – Efeitos da injeção de pilocarpina sobre a plasticidade sináptica em fatias do hipocampo.....	71
Figura 24 – Efeitos da pilocarpina sobre os níveis plasmáticos de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico.....	73
Figura 25 – Efeitos administração de pilocarpina na expressão de proteína FOS no hipocampo de ratos.....	74
Figura 26 – Avaliação de parâmetros comportamentais clássicos de ratos tratados com o antagonista do receptor NMDA memantina e uma dose ansiogênica de pilocarpina.....	76
Figura 27 – Avaliação de parâmetros comportamentais etológicos de ratos tratados com o antagonista do receptor NMDA memantina e uma dose ansiogênica de pilocarpina.....	77
Figura 28 – Efeitos da pilocarpina na expressão da subunidade NMDAR1 no hipocampo de ratos após o tratamento.....	78
Figura 29 – Efeitos da pilocarpina na expressão da subunidade NMDAR2B no hipocampo de ratos após o tratamento.....	79
Figura 30 – Esquema do mecanismo de ação sugerido para a indução dos efeitos ansiogênicos de longo prazo promovidos pela pilocarpina.....	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características experimentais do medo e da ansiedade.....	24
Quadro 2 – Classificação e descrição clínica dos transtornos de ansiedade.....	25
Quadro 3 – Efeitos desencadeados pela pilocarpina.....	38
Quadro 4 – Principais resultados obtidos nos diferentes testes empregados na investigação das respostas ansiogênicas promovidas por diferentes doses de pilocarpina.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do tratamento com diazepam ou pentilenotetrazol 24 h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos.....	65
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE: SINTOMAS E TRATAMENTOS.....	23
1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANSIOLÍTICOS ATUAIS.....	27
1.3 O SISTEMA COLINÉRGICO.....	28
1.4 O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL (HPA) E A MODULAÇÃO DA ANSIEDADE.....	32
1.5 COMORBIDADES: TRANSTORNOS DE ANSIEDADE ASSOCIADOS ÀS EPILEPSIAS.....	35
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	43
3.2 ANIMAIS.....	43
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	44
3.3.1 Testes comportamentais.....	44
3.3.1.1 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	44
3.3.1.2 Teste de condicionamento aversivo contextual (CAC).....	45
3.3.2 Registros eletrofisiológicos.....	46
3.3.2.1 Cirurgia estereotáxica.....	46
3.3.2.2 Registros de eletroencefalograma (EEG).....	47
3.3.2.3 Registro extracelular <i>in vitro</i>	48
3.3.3 Ensaios bioquímicos.....	50
3.3.3.1 Obtenção do material biológico.....	50
3.3.3.2 Dosagem plasmática de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH).....	50
3.3.3.3 Determinação da Concentração de Proteínas.....	51
3.3.3.4 Determinação da atividade da enzima de acetilcolinesterase (AChE).....	51
3.3.3.5 Imunodeteção de proteínas por <i>Western blot</i>	52
3.4 DROGAS, INJEÇÕES E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO.....	53
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4 RESULTADOS.....	57
4.1 Perfil ansiogênico de ratos tratados com doses subconvulsivantes de pilocarpina: abordagem comportamental e eletrofisiológica.....	57
4.2 Envolvimento do receptor GABA-A nas respostas ansiogênicas de ratos tratados com pilocarpina.....	61
4.3 Respostas de medo condicionado em ratos tratados com pilocarpina e avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual (CAC).....	69
4.4 Efeitos sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina: registros <i>in vitro</i>	71

4.5 Envolvimento do eixo HPA nas respostas ansiogênicas de ratos tratados com pilocarpina.....	72
4.6 Participação de receptores do tipo NMDA nas respostas ansiogênicas de ratos tratados com pilocarpina.....	75
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICE A - Artigo publicado relacionado à tese.....	119
APÊNDICE B - Artigo publicado relacionado à tese.....	133
ANEXO A – Aprovação de projeto de doutorado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	147
ANEXO B – Autorização para a condução de experimentos científicos em animais durante estágio sanduíche na <i>University of Bristol</i>.....	151

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE: SINTOMAS E TRATAMENTOS

Transtornos como o medo e a ansiedade são conhecidos por apresentar um papel evolutivo, tendo como função a preservação da vida, sendo que em indivíduos saudáveis, o medo e a ansiedade podem facilitar ações que tem como objetivo manter a segurança e o bem-estar pessoal (Lang et al., 2000).

O medo é comumente descrito como uma reação aversiva provocada pela percepção de uma ameaça específica, seja ela condicionada ou não, caracterizada em mamíferos pelas respostas comportamentais de luta, fuga ou congelamento (Gray e McNaughton, 2000). Por sua vez, a ansiedade está comumente associada a comportamentos prolongados de hipervigilância que podem ocorrer em antecipação de (ou em resposta à) uma ameaça difusa, onde o perigo não é aparentemente iminente (MacLeod e Rutherford, 1992).

De acordo com estudos experimentais desenvolvidos por Robert e Caroline Blanchard (1988), a percepção de um perigo existente, tanto nos estados de medo, como de ansiedade, é em parte uma construção cognitiva, sendo que a assimilação individual de especificidade e iminência de perigo pode modelar a experiência emocional. Portanto, a ansiedade relaciona-se aos comportamentos de avaliação de riscos observados em situações de perigo potencial - onde o estímulo aversivo não está presente - enquanto o medo está vinculado às respostas desencadeadas a partir de um estímulo aversivo real.

McNaughton e Corr (2004) estabeleceram, baseados nos trabalhos de Jeffrey Gray (1982) e Blanchard e Blanchard (1990), a teoria comportamental do sistema defensivo, onde o medo e a ansiedade distinguem-se a partir das respostas defensivas. McNaughton e Corr postularam que os estados de medo e ansiedade podem ser distinguidos a partir da motivação direcional dos comportamentos desencadeados por um estímulo (iminente ou não). Nesse sentido, o medo foi descrito como uma reação defensiva associada a respostas de luta, fuga ou congelamento durante uma situação aversiva, enquanto a ansiedade foi descrita como um estado de alerta incidente durante o período de aproximação de uma ameaça em potencial.

A ansiedade pode ainda ser caracterizada como um componente “traço”, diferenciando-se da ansiedade “estado”, onde o indivíduo

apresenta um aumento momentâneo da ansiedade devido a um estímulo ansiogênico. Em contraste, na ansiedade “traço” não há uma variação dos níveis de ansiedade ao longo do tempo, ocorrendo a persistência dos sintomas inerentes (*e.g.* hipervigilância, alerta) mesmo após a remoção da potencial ameaça (Lister, 1990). Sendo assim, baseado em critérios recentes que levam em consideração aspectos clínicos e experimentais, é possível distinguir os estados de medo e ansiedade com as seguintes características (quadro 1):

Quadro 1 - Características experimentais do medo e da ansiedade.

Dimensão	Medo	Ansiedade	Referências
Valência emocional	Negativo	Negativo	(Epstein, 1972)
Foco temporal	Presente	Futuro	(Tellegen, 1982)
Duração de alerta	Fásico (breve)	Tônico (sustentado)	(Davis, 1998)
Direção defensiva	Evitação (fuga)	Aproximação	(Epstein, 1972; Gray e McNaughton, 2000; McNaughton e Corr, 2004; Öhman, 1993)
Especificidade da ameaça	Específica	Difusa	(Davis, 1998; Lang et al., 2000; MacLeod e Rutherford, 1992)
Percepção de dor	Atenuada	Aumentada	(Rhudy e Meagher, 2000; Tang e Gibson, 2005)

Adaptado de Sylvers et al., (2011).

A exemplo dos padrões observados em modelos animais, indivíduos ansiosos tendem a atribuir de forma precipitada, periculosidade a determinados ambientes, desencadeando, conseqüentemente, alterações comportamentais, fisiológicas e emocionais relacionadas à ansiedade e ao medo (Spielberger et al., 1970). Embora esses transtornos emocionais tenham-se mostrado fundamentais ao longo dos anos nos processos de conservação e adaptação evolutiva (Belzung e Philippot, 2007), o excesso de ansiedade e dificuldades em mantê-la em níveis adequados, não patológicos, acarretam sintomas evidentes que necessitam da interferência terapêutica psicofarmacológica, como observado nos casos de ansiedade generalizada, transtorno de pânico e estresse pós-traumático (Hoffman et al., 2008), que comumente associam-se a sinais de agitação, preocupação persistente e irritabilidade, além de poder associar-se a disfunções cognitivas, fadiga, alterações do apetite, peso corporal e

disfunções sexuais e do sono (Allredge, 2010). Atualmente, os transtornos de ansiedade são classificados clinicamente conforme a 4ª edição do DSM-IV-TR (do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*) da Associação Psiquiátrica Norte-Americana (quadro 2):

Quadro 2 - Classificação e descrição clínica dos transtornos de ansiedade.

Transtornos de Ansiedade	Características Clínicas
Transtorno de ansiedade generalizada	Preocupação excessiva e inapropriada que persiste por mais de seis meses
Transtorno obsessivo-compulsivo	Obsessões (pensamentos recorrentes que causam ansiedade e desconfortos) e/ou compulsões
Transtorno de pânico (com ou sem agorafobia)	Apreensão intensa, medo ou terror, de início súbito e recorrente.
Agorafobia sem distúrbio de pânico	Presença de agorafobia e sintomas do tipo pânico, porém sem história de ataques de pânico inesperados
Transtorno de estresse pós-traumático	Revivência de acontecimento traumático acompanhado de hipervigilância e esquiva de estímulos associados ao trauma
Transtornos de estresse agudo	Sintomas semelhantes ao transtorno pós-traumático, porém ocorrendo imediatamente após o trauma
Fobias sociais	Medo excessivo, persistente e inexplicável provocado pela exposição a certos tipos de situação social ou de desempenho, frequentemente levando a comportamento de esquiva
Fobias específicas	Medo excessivo de pessoas, animais, objetos ou situações específicas, frequentemente levando a comportamento de esquiva
Transtornos de ansiedade devido a uma condição médica geral	Sintomas proeminentes de ansiedade resultantes de doença orgânica
Transtorno de ansiedade induzido por substância	Sintomas proeminentes de ansiedade resultantes do abuso de drogas, medicamentos ou exposição a toxinas
Transtornos de ansiedade sem causa específica	Ansiedade intensa ou esquiva fóbica que não se enquadra em nenhuma das classificações anteriores

Adaptado de Baldwin et al., (2005).

Estudos epidemiológicos estimam uma prevalência de transtornos de ansiedade de aproximadamente 14 % durante um período de 12 meses e 21 % ao longo da vida em indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, ocorrendo com uma incidência 2,5 vezes maior em mulheres do que em homens (Wittchen e Jacobi, 2005; Wittchen et al., 2011). No Brasil, apesar da carência de dados epidemiológicos, estudos indicam que os transtornos de ansiedade estão entre os mais incidentes na população, com prevalência entre 4 e 18 %, dependendo da região em que os estudos foram conduzidos (Almeida-Filho et al., 1997; Andrade et al., 2002). Durante décadas, o tratamento farmacológico com drogas benzodiazepínicas tem sido empregado na terapia dos transtornos de ansiedade (Nutt, 2005). Enquanto indivíduos com ataques episódicos de pânico ou alguma outra fobia são comumente tratados de forma intermitente, pacientes diagnosticados com o transtorno de ansiedade generalizada e que apresentam sintomas persistentes podem necessitar de tratamentos contínuos (Ballenger, 2000).

Nos últimos 60 anos tem-se observado um grande avanço no desenvolvimento de novas drogas para o combate dos transtornos emocionais (figura 1), apesar da resistência de determinadas fobias a alguns tratamentos e dos efeitos colaterais (*e.g.* relaxamento muscular, tolerância, dependência, potencialização dos efeitos depressores do álcool, adição) observados após o uso de alguns fármacos com ação sobre receptores benzodiazepínicos e serotoninérgicos (Andreatini et al., 2001; McNaughton, 2011; Nutt, 2005). Entre outras classes de fármacos frequentemente empregados na clínica, pode-se ainda citar: os antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptção de serotonina e/ou de noradrenalina (Holmes et al., 2003); os β -bloqueadores, que atuam por um sistema de *feedback* negativo, diminuindo a influência da percepção de alguns sintomas periféricos (*e.g.* tremores, suor, taquicardia) e nos sintomas cognitivos da ansiedade (Tyrer, 1992); o uso clínico de drogas antipsicóticas, mas com efeitos adversos que restringem seu uso; além dos fitoterápicos (Andreatini et al., 2001; Faustino et al., 2010).



Figura 1 - Histórico do desenvolvimento das drogas ansiolíticas. Abreviações: ATCs, antidepressivos tricíclicos; ISRSs, inibidores seletivos da recaptação de serotonina; IRSs, inibidores da recaptação de serotonina; IMAOs, inibidores da monoamina oxidase; IRMAO; inibidores reversíveis da monoamina oxidase tipo A (adaptado de Nutt, 2005).

1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANSIOLÍTICOS ATUAIS

Vários sistemas de neurotransmissão estão envolvidos no controle da ansiedade, assim como, no seu tratamento. Os primeiros estudos acerca deste transtorno enfatizaram a participação do sistema GABAérgico - em especial o sítio benzodiazepínico do receptor GABA-A - na modulação destes processos (Möhler, 2012). Posteriormente, foi observada a participação de outros sistemas, como o glutamatérgico, serotonérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e também alguns neuropeptídios, na regulação dos transtornos de ansiedade (Bergink et al., 2004). Grande parte desses transtornos está relacionada à hiperexcitabilidade neuronal, sendo que investigações do papel de sistemas de neurotransmissão que alteram efetivamente esta propriedade celular podem esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na modulação da ansiedade e promover a descoberta de novos tratamentos com maior potencial terapêutico (Cortese e Phan, 2005). Além disso, alterações dos níveis basais de transmissão excitatória para níveis excessivos podem causar excitotoxicidade, resultando no desenvolvimento de diversas patologias (*e.g.* transtornos de pânico, mania, ansiedade e epilepsias) (Bergink et al., 2004).

Assim como em outras patologias neurológicas, inúmeras regiões encefálicas estão envolvidas na regulação dos estados de medo e ansiedade (*e.g.* córtex pré-frontal e sensorial, hipocampo, núcleo da estria terminal, amígdala e hipotálamo). Conforme postulado por Gray e McNaughton (1982) - baseados em estudos que investigaram as consequências comportamentais de lesões ou inativação de estruturas específicas -, o sistema septo-hipocampal tem função primordial na regulação da ansiedade. Esse sistema é responsável por engatilhar respostas de ansiedade frente a situações de conflito (*e.g.* aproximar-se ou esquivar-se de um estímulo potencialmente aversivo) caracterizadas pela interrupção de um comportamento em curso e aumentando os níveis de alerta e atenção. Em consequência, este conflito promove a inibição imediata de programas motores que estão sendo executados. Dessa forma, o sistema septo-hipocampal torna-se a base neuroanatômica desse “sistema de inibição comportamental”, sendo sensível à modulação de projeções noradrenérgicas, serotoninérgicas e colinérgicas (Gray e McNaughton, 2000). O hipocampo recebe informações do septo medial sobre punições ou acontecimentos sem recompensa, ativando o sistema de inibição comportamental. Ao “avaliar” essa situação, o hipocampo ajusta suas eferências (via *subiculum*) sinalizando aos núcleos do septo lateral que, por sua vez, alteram as eferências dos núcleos do septo medial ao hipocampo, atenuando a inibição normal do comportamento não recompensado (Gray e McNaughton, 2000; Pratt, 1992).

Células piramidais glutamatérgicas (McDonald, 1996) e colinérgicas (Acquas et al., 1996; Zhu et al., 2001) inervam ricamente regiões límbicas (*e.g.* amígdala, hipocampo, córtex cingulado anterior, pré-frontal medial e insular) que estão diretamente implicadas na modulação dos estados de medo e ansiedade, tanto em animais quanto em humanos (Adolphs, 2002; Davis et al., 1994; Degroot e Nomikos, 2006; Graef et al., 2011; LeDoux, 1994).

1.3 O SISTEMA COLINÉRGICO

É postulado que a via colinérgica septo-hipocampal também está intimamente envolvida na regulação de respostas hormonais e comportamentais do estresse em roedores (Acquas et al., 1996; Ceccarelli et al., 1999; Kaufer et al., 1998; Meshorer et al., 2002; Zhu et al., 2001). Os neurônios colinérgicos estão esparsamente distribuídos pelo sistema nervoso central, localizados no tronco encefálico, se

projetando caudalmente para a medula espinhal e tegumento ponto-mesencefálico, e rostralmente pelo diencéfalo até o telencéfalo (figura 2, Woolf, 1991). O tratamento com drogas anticolinérgicas e a lesão de projeções colinérgicas ascendentes promovem efeitos comportamentais e mudanças neurais muito similares às encontradas após manipulações experimentais no sistema noradrenérgico e serotoninérgico (além de projetar seus axônios de forma similar a estes sistemas), modificando a sinalização neural em alvos como o hipocampo e amígdala (Gray e McNaughton, 2000).

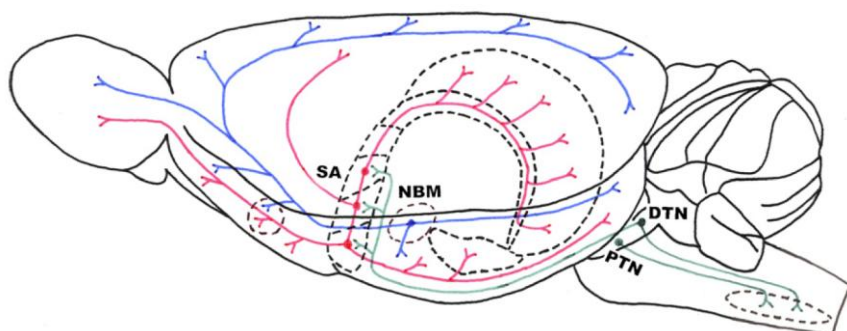


Figura 2 – Vista sagital do encéfalo de rato enfatizando as projeções colinérgicas. Neurônios dos núcleos basais magnocelulares (NBM) enviam axônios para todo o córtex e bulbo olfatório (em azul). Neurônios da área septal (SA) enviam axônios ao hipocampo e córtex cingular, piriforme e entorrinal até o bulbo olfatório e amígdala (em vermelho). Neurônios do núcleo tegumental dorsolateral (DTN) enviam axônios ao septo medial e banda diagonal e para o tronco encefálico que também recebe projeções dos núcleos tegumentais pedúnculo-pontinos (PTN, em verde) (Myhrer, 2007).

A acetilcolina exerce suas funções fisiológicas acoplando-se a receptores nicotínicos (ionotrópicos) e muscarínicos (metabotrópicos) pré e pós-sinápticos, onde regulam a excitabilidade neuronal, transmissão e plasticidade sináptica (Cobb e Davies, 2005; Wess, 1996). A principal via hipocampal excitatória é composta por neurônios piramidais que são modulados principalmente por receptores muscarínicos (Frazier et al., 1998) e são distinguidos em cinco subtipos (M1-M5). Esses receptores são ainda subdivididos em duas classes funcionais, conforme a funcionalidade das proteínas G que estão acopladas ao receptor, modulando a atividade de uma vasta gama de fosfolipases, canais iônicos, proteínas quinases e outras moléculas de

sinalização (Wess et al., 2007). Receptores M1, M3 e M5 acoplam-se seletivamente às proteínas G da família Gq/G11, enquanto receptores M2 e M4 ativam preferencialmente proteínas G da família Gi/Go (figura 3, Caulfield e Birdsall, 1998).

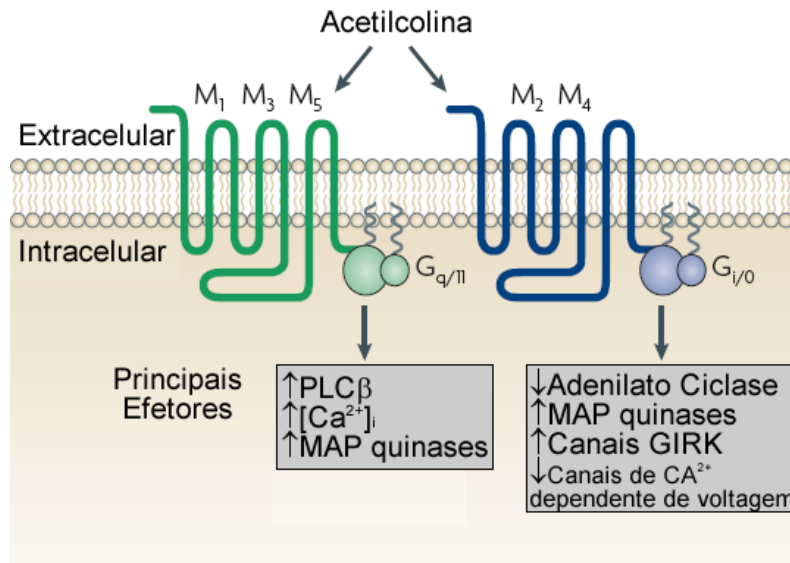


Figura 3 – Classificação e função dos receptores colinérgicos muscarínicos. Abreviações: PLCβ, fosfolipase C β; MAP quinases, proteínas quinases ativadas por mitógenos; GIRK, canal de potássio sensível à proteína G (adaptado de Wess et al., 2007).

Os receptores muscarínicos - assim como os glutamatérgicos - estão densamente expressos em regiões límbicas, sendo que 60 % daqueles localizados no hipocampo são do subtipo M1 (Dasari e Gullledge, 2011; Flynn et al., 1995). A ativação de receptores M1 potencializa a transmissão excitatória de células piramidais da região hipocampal através de receptores do tipo NMDA que se encontram colocalizados (Volpicelli e Levey, 2004). Os receptores NMDA são compostos por diferentes subunidades, classificando-se em NR1 (ligando-se à glicina) apresentando regulação excitatória, NR2A-D (ligando-se ao glutamato) e NR3A ou B (ligando-se à glicina) apresentando regulação inibitória (Barkus et al., 2010). Grishin e colaboradores (2005) mostraram que a estimulação de receptores muscarínicos do tipo M1 reduz as correntes iônicas de receptores NMDA das células piramidais da região CA3 do hipocampo (Grishin et

al., 2004; 2005). Além disso, mostraram que o bloqueio do funcionamento das proteínas G ou o esgotamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} preveniu a depressão muscarínica das correntes iônicas dos receptores NMDA, indicando que a via que compreende o receptor M1, a ativação de proteína G e a liberação de Ca^{2+} representa a sequência inicial do mecanismo de transdução. Subsequentemente, a ativação dependente de Ca^{2+} /calmodulina, que por sua vez ativa a proteína tirosina fosfatase, leva à dessensibilização (*down regulation*) dos receptores NMDA (figura 4, Grishin et al., 2005). Nesse sentido, alterações no funcionamento deste sistema também estão ligadas a distúrbios emocionais, como os transtornos de ansiedade e depressão (Curia et al., 2008; Graef et al., 2011; Platt e Riedel, 2011), e a modificações cognitivas, interferindo nos processos de aprendizado e memória (Micheau e Marighetto, 2011), atenção (Klinkenberg et al., 2011), vigília (Platt e Riedel, 2011) e epilepsia (Friedman et al., 2007).

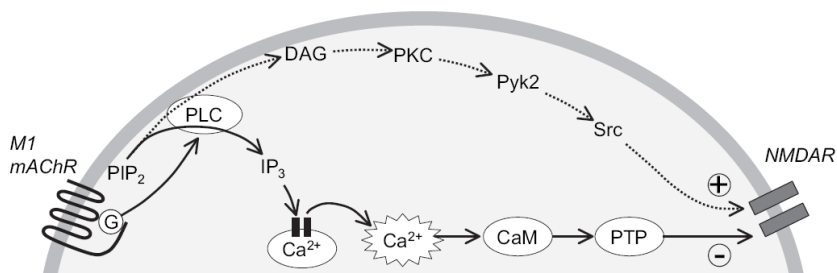


Figura 4 - Diagrama esquemático mostrando a via dependente de Ca^{2+} mediando a depressão induzida pela ativação do subtipo M1 dos receptores muscarínicos na função do receptor NMDA em células piramidais da região CA3 do hipocampo. Abreviações: PIP_2 , fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PLC, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C; Src, tirosina quinase Src; IP_3 , trifosfato inositol; CaM, calmodulina; PTP, proteínas tirosina fosfatases (adaptado de Grishin et al., 2005).

Conforme já relatado em relação à teoria de Gray, o hipocampo e o septo agem em consonância no controle dos transtornos de ansiedade (Gray e McNaughton, 2000; Gray e McNaughton, 1983). Além de se projetar em regiões límbicas vitais para o controle da ansiedade, aferências colinérgicas também são responsáveis pelo controle da atividade teta hipocampal, um padrão de disparos de neurônios da formação hipocampal que originam um ritmo eletrográfico lento (5-10 Hz) e de grande amplitude durante registros de eletroencefalograma

(EEG), exercendo também uma influência direta sobre a função hipocampal e, conseqüentemente, a regulação dos estados de ansiedade (Gray e McNaughton, 2000). A atividade teta na formação hipocampal é o resultado da atividade fásica de sistemas subcorticais, modulada principalmente pela atividade de eferências colinérgicas e serotoninérgicas (Gray e McNaughton, 2000). Uma sincronização temporal aumentada desse ritmo também é observada em pacientes com epilepsia do lobo temporal (Babiloni et al., 2009) e está relacionada a respostas de medo (Lesting et al., 2011) e ansiedade (Adhikari et al., 2010; Adhikari et al., 2011).

Além disso, disfunções do sistema colinérgico estão vinculadas a alterações do estado de estresse (McEwen, 2000), uma vez que o mesmo pode desencadear mudanças de longo prazo sobre a expressão gênica colinérgica tanto no neocórtex como no hipocampo de camundongos (Kaufer et al., 1998). A resposta de estresse é ativada ou facilitada por neurônios do tronco encefálico (inclusive os colinérgicos) que se projetam para o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo e ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), aumentando os níveis de ansiedade (Bhatnagar et al., 1997; Steimer, 2002).

1.4 O EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL (HPA) E A MODULAÇÃO DA ANSIEDADE

Em mamíferos, as respostas fisiológicas (*e.g.* tremores, tensão muscular, sudorese, palpitações, vertigens) desencadeadas na presença de um estímulo estressor são mediadas primariamente pelo eixo HPA (O'Brien, 1997; Sapolsky et al., 2000). Os sinais neurais associados ao estressor são traduzidos em uma resposta endócrina no hipotálamo, mais precisamente pelo PVN, um centro de integração que recebe e coordena informações neuroendócrinas, autonômicas, cognitivas e emocionais e é o responsável pela iniciação da secreção dos glicocorticoides (López et al., 1999). Tanto o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) quanto a arginina vasopressina são secretados pelo PVN no sistema portal hipofiseal, onde atingem a glândula hipofisária anterior e, sinergicamente, estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é transportado pela corrente sanguínea até o córtex da adrenal, onde estimula a liberação de glicocorticoides (Phillips et al., 2006).

Os glicocorticoides possuem dois tipos de receptores, os mineralocorticoides (MR, tipo I), que possuem uma alta afinidade a

glicocorticoides endógenos como a corticosterona em roedores (cortisol em humanos) e estão densamente expressos no hipocampo e septo (Reul e de Kloet, 1985), e os receptores de glicocorticoides (GR, tipo II), que apresentam uma baixa afinidade a glicocorticoides endógenos porém alta afinidade a esteroides sintéticos, como a dexametasona (De Kloet et al., 1998). Os receptores MR são ativados por baixos níveis de corticosterona circulante e estão primariamente envolvidos na manutenção da atividade basal do eixo HPA. Por outro lado, receptores GR respondem quando os níveis de glicocorticoides elevam-se e receptores MR tornam-se saturados, tanto devido às oscilações naturais do ritmo circadiano ou em resposta ao estresse. Quando isso ocorre, receptores GR moderam a atividade de glicocorticoides e são responsáveis pela finalização das respostas de estresse através da inibição por *feedback* negativo, geralmente através do hipotálamo e da hipófise (Phillips et al., 2006). Além disso, a atividade do eixo HPA também é regulada por estruturas límbicas, incluindo o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. O hipocampo possui altas concentrações de receptores MR e GR, e possui um importante papel inibitório na atividade basal do eixo HPA e na finalização das respostas de estresse (Jacobson e Sapolsky, 1991).

A ativação do eixo HPA durante o estresse agudo promove uma elevação transitória da concentração plasmática de corticosteroides e uma resistência parcial ao *feedback* inibitório da liberação de corticosterona que persiste durante e pouco tempo após o estímulo estressor (Charney, 2003). Esse fenômeno pode envolver uma rápida dessensibilização dos receptores de glicocorticoides tendo em vista que os seus níveis elevados (como àqueles provocados pelo estímulo estressor) diminuem o número dos seus receptores no hipocampo, resultando no aumento da secreção de corticosterona e resistência do *feedback*. Assim que o estímulo estressor não está mais presente, ocorre a diminuição dos níveis de glicocorticoides (provavelmente devido à diminuição da função límbica sobre a liberação de CRH), a densidade dos receptores de glicocorticoides aumenta e o *feedback* se normaliza (Sapolsky e Plotsky, 1990). Diferenças na regulação da função do CRH pela estimulação dos receptores de glicocorticoides e estresse podem promover efeitos importantes na mediação dos estados de medo e ansiedade (Schulkin et al., 1998). O *feedback* negativo da função de CRH pelos glicocorticoides ocorre no PVN do hipotálamo e na hipófise anterior (figura 5, Makino et al., 1995).

Diversos estudos têm mencionado o hipocampo como responsável por exercer uma função inibitória sobre o eixo HPA, uma vez que a sua estimulação diminui a secreção de glicocorticoides tanto em ratos como em humanos (Dunn e Orr, 1984; Rubin et al., 1966), além de estar envolvida na finalização dessas respostas ao estresse (Herman et al., 2003; Ulrich-Lai e Herman, 2009). O hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal recebem densas projeções colinérgicas do prosencéfalo basal e, em particular, do septo medial e dos núcleos basais (Mesulam, 1995), sendo que os níveis de acetilcolina no hipocampo e córtex podem aumentar consideravelmente após o estresse por contenção em ratos (Power e Sah, 2008). A forma na qual a função colinérgica converge para regular as eferências hipocampais em resposta ao estresse ainda é desconhecida, embora seja sugerido que os efeitos da ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos na transmissão excitatória e inibitória sirvam para regular a ritmicidade da atividade teta (Drever et al., 2011; Fisahn et al., 1998), fundamental nos processos de memória, transtornos de humor e ansiedade (Femenía et al., 2012).

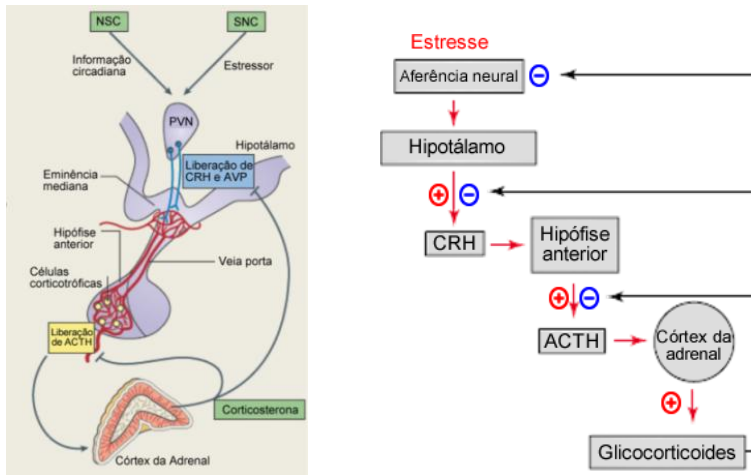


Figura 5 – Esquema do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O estímulo estressor aumenta a liberação do hormônio CRH no hipotálamo, ligando-se a receptores nas células da hipófise anterior e, conseqüentemente, liberando ACTH. O ACTH é levado via corrente sanguínea ao córtex da adrenal, estimulando a produção e liberação de glicocorticoides que causam alterações metabólicas em resposta ao estímulo estressor e fornecem *feedback* negativo para diminuir a síntese e liberação de CRH e ACTH. Abreviações: NSC, núcleo supra quiasmático; SNC, sistema nervoso central (adaptado de Lightman e Conway-Campbell, 2010; Seong et al., 2002).

1.5 COMORBIDADES: TRANSTORNOS DE ANSIEDADE ASSOCIADOS ÀS EPILEPSIAS

O termo “comorbidade” é conceituado na prática clínica pela coexistência de vários transtornos que acometem um paciente ao mesmo tempo (Feinstein, 1970). Vários estudos demonstram que a taxa de incidência de distúrbios emocionais é consideravelmente maior em pacientes epiléticos do que outras doenças crônicas (Beyenburg et al., 2005; Devinsky, 2003; Jackson e Turkington, 2005). Embora grande parte desses trabalhos tenha focado seus estudos na área da depressão, transtornos relacionados à ansiedade têm acometido os pacientes epiléticos de forma similar (Marsh e Rao, 2002; Swinkels et al., 2001; Vazquez e Devinsky, 2003), sendo não só comum em humanos como também em modelos animais de epilepsia (Babu et al., 2009; Jones et al., 2008; Szyndler et al., 2005). Um estudo recente realizado no Brasil apontou que a maioria dos indivíduos epiléticos avaliados apresentavam algum transtorno de humor (48,2 %) ou ansiedade (30,7 %), sendo ainda muito comum a associação entre estas duas patologias (20,5 %) (figura 6, Bragatti et al., 2011).

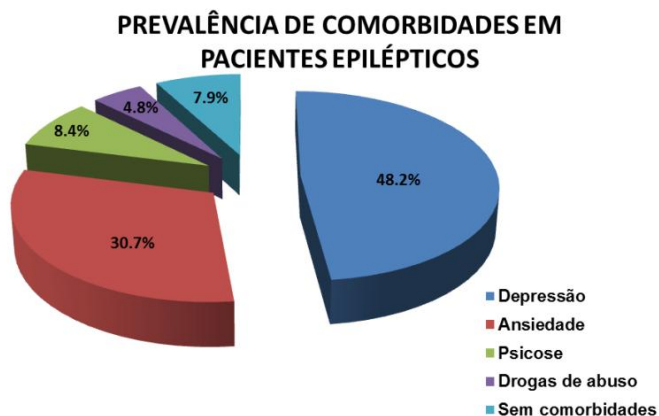


Figura 6 – Prevalência de comorbidades em pacientes epiléticos (adaptado de Bragatti et al., 2011).

As epilepsias são caracterizadas por um estado crônico de hiperexcitabilidade neuronal e hipersincronia, manifestada por crises parciais recorrentes, seguidas ou não por crises secundárias generalizadas (Cavazos et al., 2004). O tratamento farmacológico das

epilepsias apresenta-se ineficaz em 30 % dos pacientes, sendo a grande parte desses indivíduos acometidos pela epilepsia do lobo temporal (ELT) (Lothman et al., 1991; Löscher, 2002; Porter e Rogawski, 1992; Tilelli et al., 2005).

A habilidade de reproduzir doenças humanas em modelos animais representa uma grande vantagem para a medicina experimental moderna (Russel, 1964). O modelo animal ideal deve ser homólogo, replicando o distúrbio humano em todos os aspectos. No entanto, o modelo animal pode ser isomórfico, quando replica o distúrbio mas não as bases etiológicas (que em várias doenças neurológicas ainda são desconhecidas), ou preditivo, nos casos onde não se assemelham ao distúrbio humano mas respondem ao tratamento com fármacos utilizados na clínica (van der Staay et al., 2009).

O modelo animal da pilocarpina – um agonista colinérgico muscarínico não-seletivo - apresenta um alto grau isomórfico com a epilepsia do lobo temporal em humanos, e por isso tem sido utilizado por diferentes grupos de pesquisa desde seu primeiro relato há 30 anos (Curia et al., 2008; Turski et al., 1983a; Turski et al., 1983b), pois apresenta várias vantagens em relação a outros modelos como: a rápida indução do *status epilepticus*; presença de um período latente seguido pelo surgimento de crises espontâneas recorrentes (Cavalheiro et al., 1991; Leite et al., 1990); promoção de lesões esparsas no encéfalo, sendo algumas delas localizadas nos mesmos locais afetados em humanos e associadas à reorganização da rede neural em regiões hipocámpais (Wieser e Epilepsy, 2004).

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas do *Pilocarpus jaborandi*, um arbusto originário do Brasil, e foi isolada pela primeira vez por Hardy e Gerrard em 1875 (Davies et al., 2009). Na clínica, a droga é empregada no tratamento de glaucoma, aumentando o escoamento de fluido dos olhos e reduzindo a pressão intra-ocular (Wollensak e Kewitz, 1976). Doses menores são também utilizadas para induzir o aumento da salivação durante a coleta de amostras clínicas (Smith et al., 1982), além de promover suor excessivo, broncoespasmo, aumento da secreção da mucosa brônquica, taquicardia, hipertensão, diarreia e miose, quando aplicada de forma crônica nos olhos (Tang e Loke, 2011).

Em modelos experimentais, quando administrada em altas doses (acima de 300 mg/kg), a pilocarpina promove episódios comportamentais de ordem epileptogênica associados a descargas eletrográficas (durante registros no EEG) que aumentam

progressivamente na sua duração e dispersão (Cavalheiro et al., 1991; Leite et al., 1990). A partir do esbecimento do *status epilepticus*, a administração de atropina (um antagonista colinérgico) não é mais capaz de controlar as crises induzidas, sugerindo a participação de elementos não colinérgicos (e.g. glutamato, GABA e dopamina) na manutenção dessas crises - em especial o envolvimento dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que quando antagonizados desencadeiam efeitos anti-convulsivantes (figura 7 e quadro 3, Jope et al., 1986; Meurs et al., 2008; Nagao et al., 1996; Ormandy et al., 1989; Smolders et al., 1997).

Aproximadamente 75 % dos animais tratados com doses elevadas (convulsivantes) de pilocarpina apresentam crises com clônus e comportamento de levantamento e/ou quedas por perda de reflexo postural, conforme a escala de severidade de Racine (Racine, 1972), havendo uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40 % dos ratos tratados (Cavalheiro et al., 1991; Curia et al., 2008; Liu et al., 1994; Turski et al., 1983a).

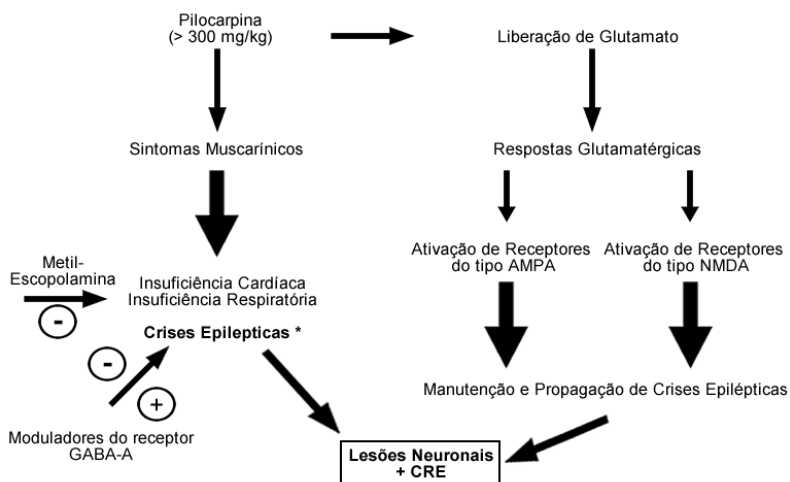
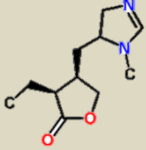


Figura 7 - Efeitos fisiológicos desencadeados pela administração sistêmica de pilocarpina (a partir de doses convulsivantes, acima de 300 mg/kg). A ativação de receptores muscarínicos promove a liberação de glutamato que, em excesso, induz respostas excitotóxicas (pela ativação de receptores AMPA e NMDA) e lesões nervosas. Abreviação: CRE, crises recorrentes espontâneas (adaptado de Collombet, 2011).

Quadro 3 – Efeitos desencadeados pela pilocarpina.

Pilocarpina (C₁₁H₁₆N₂O₂)			
Estrutura		Alvo	Receptores muscarínicos (agonista)
Mecanismo de geração das crises	1) Iniciação da crise pela ativação do receptor muscarínico; 2) Manutenção da crise pela modulação de glutamato, GABA ou dopamina; 3) Outras moléculas como receptores de adenosina, citocinas, quimiocinas e canais de cálcio podem também estar envolvidos na manutenção do <i>status epilepticus</i> e início das crises recorrentes espontâneas	Patologia	Axônios e dendritos Brotamento axonal e dendritos recentemente brotados com espinhas dendríticas tipo cone de crescimento são encontrados no sistema límbico na fase crônica do <i>status epilepticus</i>
Respostas genômicas	Genes superexpressos Sox11, α -protimosina, receptores da proteína quinase C, neuropeptídeo Y, timosina- β -10, CD9, CD24, β -tubulina, T- β -15 vimentina, proteína ligante ao ácido graxo		Lesão neuronal Perda neuronal, em particular, interneurônios presentes no hipocampo, amígdala, tálamo, <i>subculum</i> piriforme e córtex entorrinal, neocórtex e substância nigra
	Genes hipoexpressos GAS-7, R-esp1, NVP-2, PDK2, PMCA-3, hipocalcinina, receptor de IP3, proteína Ca ²⁺ /calmodulina II, quinase- β , receptor GABA-A, prodinorfina, dendrina, proteína de membrana neural 35	Neurogênese A neurogênese das células granulares é aumentada na fase inicial (primeiras 3 semanas) após a indução de <i>status epilepticus</i> , mas diminuída logo após	

(Adaptado de www.chemspider.com e Tang e Loke, 2011).

A indução de *status epilepticus* a partir da administração de cloreto de lítio e pilocarpina em ratos jovens promove déficit de memória quando avaliados no teste do labirinto aquático de Morris, além de promover uma maior incidência de comportamentos do tipo-ansiosígenicos no teste do labirinto em cruz elevado 3 meses após o

tratamento (Cilio et al., 2003; de Oliveira et al., 2008; Kubová et al., 2004). Por outro lado, uma única dose de pilocarpina (300 mg/kg) administrada sistemicamente foi capaz de prevenir os déficits cognitivos de aprendizagem e memória observados em ratos idosos (21 meses) no labirinto aquático quando administrada aos 3 meses de idade em ratos que não apresentaram *status epilepticus*, sugerindo que as alterações relacionadas à idade avançada podem ser prevenidas por uma alteração a longo prazo do sistema colinérgico ou outra via de neurotransmissão (De-Mello et al., 2005).

Camundongos que apresentaram *status epilepticus* e, posteriormente, crises espontâneas recorrentes após a administração de pilocarpina demonstraram um aumento dos níveis de ansiedade, conforme observado em diferentes testes comportamentais (*e.g.* campo aberto, caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado, placa perfurada), além de prejuízo no aprendizado espacial e memória quando avaliados no labirinto aquático de Morris e de lesões hipocâmpais (principalmente em células piramidais da região CA1 e CA3), refletindo várias respostas comportamentais e prejuízos cognitivos que se associam ao observado em pacientes epiléticos (Müller et al., 2009a; Müller et al., 2009b).

Os mecanismos neurobiológicos envolvidos no binômio epilepsia-ansiedade são pouco compreendidos, sendo que estudos sistemáticos nessa área ainda são escassos (figura 8). Alguns pesquisadores têm focado seus estudos no comportamento de roedores epiléticos após o abrasamento (*kindling*) de estruturas límbicas (Adamec, 1990; Adamec e Morgan, 1994; Kalynchuk et al., 1997) ou crises convulsivas induzidas por drogas que modificam o balanço excitatório/inibitório do sistema nervoso central (Erdoğan et al., 2005; Gröticke et al., 2007), relacionando o perfil ansiogênico destes roedores às descargas ictais observadas durante registros de EEG.

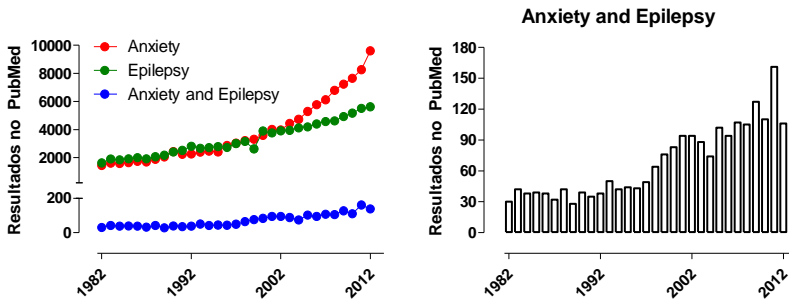


Figura 8 - Incidência anual (dos últimos 30 anos) de trabalhos publicados em diferentes periódicos utilizando os termos de busca na língua inglesa “*anxiety*” (ansiedade), “*epilepsy*” (epilepsia) e “*anxiety and epilepsy*” (ansiedade e epilepsia), disponíveis na base de dados PubMed, desenvolvido pelo Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (NCBI) e mantido pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (adaptado de www.pubmed.com, acessado em 15/04/2013).

Embora o modelo da pilocarpina tenha sido amplamente estudado, é evidente que um número significativo de animais submetidos a esse tratamento não desenvolvem *status epilepticus* (Cavalheiro et al., 1994; Hort et al., 1999; Mello et al., 1993; Turski et al., 1987), sendo estes animais geralmente descartados dos estudos. Um estudo piloto conduzido pelo nosso grupo de pesquisa revelou que ratos que não desenvolvem *status epilepticus* após a injeção de uma dose elevada de pilocarpina (350 mg/kg) apresentam um perfil ansiogênico quando avaliados no labirinto em cruz elevado 1 mês após o tratamento. Tais resultados levaram a um grande interesse em melhor entender esses efeitos, uma vez que grande parte dos investigadores tem focado sua atenção na geração e propagação das crises induzidas por agentes convulsivantes, minimizando ou desconsiderando as alterações emocionais ou cognitivas consequentes ao tratamento. Além disso, o atual patamar das pesquisas pré-clínicas evidencia uma série de limitações encontradas no campo translacional dos transtornos psiquiátricos para modelos animais, associadas à baixa taxa de implementação clínica de terapias alternativas que possam auxiliar o tratamento dos transtornos de ansiedade, tornando-se necessário a busca de novas estratégias com diferentes alvos terapêuticos (e.g. sistema muscarínico).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar o comportamento de ratos que não convulsionam frente ao tratamento com pilocarpina – um agonista colinérgico não seletivo dos receptores muscarínicos – e os possíveis mecanismos celulares adaptativos envolvidos nessas respostas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar as respostas emocionais de longo prazo observadas em ratos tratados com doses subconvulsivantes de pilocarpina;
- Quantificar as atividades hipocampal e cortical observadas em ratos tratados com doses subconvulsivantes de pilocarpina;
- Investigar os efeitos de curto e longo prazo promovidos pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina e o envolvimento dos receptores do tipo GABA-A na modulação dessas respostas;
- Quantificar as atividades hipocampal e cortical observadas em ratos tratados com uma dose subconvulsivante de pilocarpina e o envolvimento dos receptores do tipo GABA-A na modulação dessas respostas;
- Estudar as possíveis alterações da atividade da enzima acetilcolinesterase no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos após o tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina e o envolvimento dos receptores do tipo GABA-A na modulação dessas respostas;
- Averiguar os efeitos de curto e longo prazo promovidos pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina sobre as respostas de medo condicionado;
- Determinar os efeitos de curto e longo prazo promovidos pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina sobre a plasticidade sináptica;
- Investigar os efeitos de curto e longo prazo promovidos pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina sobre o funcionamento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA);

- Determinar os efeitos de curto e longo prazo promovidos pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina sobre a expressão de proteína FOS na região do hipocampo;
- Caracterizar a participação de receptores do tipo NMDA nas respostas comportamentais de curto e longo prazo promovidas pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina;
- Investigar os efeitos de curto e longo prazo promovidos pelo tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina sobre a expressão de receptores do tipo NMDA na região do hipocampo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos conforme os padrões internacionais do bem-estar animal e recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram delineados de tal maneira a minimizar o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado um tamanho de amostras mínimo e adequado para as análises estatísticas e extraído o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com os protocolos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 23080.025621/2009-03 (anexo A), e pelo Ato de Animais (Procedimentos Científicos) - *Animals (Scientific Procedures) Act* - de 1986, sob o número 30/2512 (anexo B), licença pessoal 30/9626.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos, com idade aproximada de 2 a 3 meses e pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais foram alojados em grupos de 4 – 5 por caixa e mantidos em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e em um ciclo claro-escuro de 12 h (7 h – 19 h, claro sob luz artificial), com livre acesso à água e ração, exceto durante os experimentos.

Os experimentos conduzidos na Universidade Federal de Santa Catarina foram realizados com animais provenientes do Biotério Central da própria universidade, enquanto os experimentos conduzidos na Universidade de Bristol foram realizados com animais provenientes dos Laboratórios Charles River (Inglaterra). Ratos foram transferidos e permaneceram alojados por, pelo menos, 5 dias antes da realização dos experimentos para habituação às condições laboratoriais, sendo conduzidos durante a fase claro do ciclo (entre 13 h e 18 h).

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Testes comportamentais

3.3.1.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste utilizado para mensurar respostas vinculadas à ansiedade em animais. O aparato surgiu a partir da adaptação do labirinto em Y, criado por Montgomery em 1955, sendo desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado inicialmente para ratos por Pellow et al. (1985). O LCE (EP151, Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 cm) de madeira, opostos em forma de cruz e elevados a 40 cm do chão. Os braços estão conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). Com intuito de prevenir a queda dos animais, os braços abertos são circundados por barras laterais de 1 cm de altura. O aparato foi alocado em uma sala iluminada com luz vermelha (15 W) com intensidade de 3 lux no assoalho do equipamento.



Figura 9 – Labirinto em cruz elevado (adaptado de <http://insightltda.com.br>).

Ao início do teste, os animais foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento avaliado durante 5 min (Pellow et al., 1985). As medidas comportamentais registradas neste teste foram: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados

(considerou-se a entrada em um dos braços quando a maior parte do corpo do animal estava dentro do respectivo braço), parâmetros etológicos de avaliação de risco como imersões de cabeça desprotegidas (*unprotected head-dipping*), estiramentos corporais protegidos (*protected stretch-attend postures*), exploração da região distal dos braços abertos e comportamento de levantar, para aumentar a sensibilidade do teste (Rodgers e Cole, 1994; Rodgers e Dalvi, 1997). O aparato foi limpo com solução de etanol 10 % entre cada sessão.

Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante, foi calculada a porcentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Para os demais parâmetros observados, fez-se a soma simples das frequências obtidas.

3.3.1.2 Teste de condicionamento aversivo contextual (CAC)

O teste de condicionamento aversivo contextual (CAC) é baseado no modelo de Pavlov (1927) e é acreditado por ter um grande potencial translacional em relação a testes tradicionalmente empregados na investigação dos transtornos de ansiedade, servindo como ferramenta no estudo das bases neurais (Garakani et al., 2006; Grillon e Baas, 2003). O teste consiste em uma caixa de condicionamento ao contexto (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) com dimensões de 22 x 22 x 25 cm, dotada de chão gradeado conectado a um gerador de choques elétricos. Os animais foram colocados na caixa e após 3 min receberam choque nas patas (1,5 mA/1 s), permanecendo por mais 1 min na caixa de condicionamento para contextualização. Após 24 h, os animais foram reexpostos ao aparato por 5 min e o tempo do comportamento de congelamento (*freezing*) quantificado, conforme previamente descrito por Pamplona e Takahashi (2006). O comportamento de congelamento é definido como um estado de imobilidade em uma posição estereotipada de agachamento, associado a respostas como pilo-ereção, aumento da frequência cardíaca e liberação de hormônios de estresse (Fanselow, 1980). A sala de experimentação foi iluminada com uma luz vermelha (15 W) com intensidade aproximada de 3 Lux no ambiente.



Figura 10 – Caixa de condicionamento ao contexto (adaptado de <http://insightltda.com.br>).

3.3.2 Registros eletrofisiológicos

3.3.2.1 Cirurgia estereotáxica

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica sob anestesia geral para a implantação de eletrodos bipolares em regiões encefálicas para o registro de eletroencefalograma (EEG). A anestesia foi realizada com quetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil, 100 mg/kg) e xilazina (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil, 20 mg/kg) e, após constatação da perda de reflexos álgicos (retirada da pata frente a compressão da pata), foi realizada tricotomia da região cefálica e o animal posicionado no aparelho estereotáxico (Stoelting®, mod. 300, EUA), sendo fixados por duas barras auriculares e uma presilha nasal. Após administração subcutânea de cloridrato de lidocaína (Lidostesim®, 2 % com vasoconstritor, DLA Pharmaceutical Ltda., SP, Brasil) na região posterior da cabeça para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo após a incisão no tecido, o periósteo foi raspado, expondo a superfície do crânio. A calota foi limpa com algodão e água oxigenada com intuito de facilitar a visualização dos pontos antropométricos *lambda* e *bregma*, utilizados como referência para marcação das coordenadas estereotáxicas. Ato contínuo, a calota foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação dos eletrodos de implante subcortical e cortical.



Figura 11 - Cirurgia estereotáxica para o implante dos eletrodos (foto do autor).

Os eletrodos bipolares eram constituídos por dois fios entrelaçados de NiCr (150 μm de diâmetro) revestidos por uma fina camada de teflon (7 μm) em toda a sua extensão (raspados nas extremidades) e implantados na região CA3 do hipocampo (AP = -3.3; ML = +2.5; DV = -3.8), enquanto os eletrodos corticais foram posicionados manualmente na região A3 (AP = -1.5; ML = -3.0), conforme o atlas estereotáxico de ratos de Paxinos e Watson (1997). Um micro parafuso foi também implantado próximo ao seio frontal do crânio, servindo como aterramento do sistema. Os eletrodos foram soldados a um micro conector de saída e fixados ao crânio com acrílico autopolimerizante (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., SP, Brasil).

Após o término das cirurgias, os animais ficaram sob observação e aquecidos por uma lâmpada de 40 W, a fim de amenizar a hipotermia induzida pela anestesia geral e, depois de recuperados, foram alojados aos pares em suas caixas recebendo água e ração à vontade, por, pelo menos, 5 dias até o início dos experimentos.

3.3.2.2 Registros de eletroencefalograma (EEG)

Os registros de eletroencefalograma (EEG) foram obtidos através do sistema poligráfico digital BIOPAC (MP-100/WSW, Inc). Os sinais foram amplificados 20.000 x e filtrados por um filtro *notch* de 60

Hz, digitalizados com uma taxa de amostragem de 256 Hz e registrados através do programa *ACQ Knowledge®*, versão 3.2.

Aproximadamente cinco dias após a cirurgia estereotáxica, cada animal foi individualmente colocado em uma caixa de vidro (0,3 x 0,5 x 0,4 m) com serragem no assoalho, e esta caixa inserida dentro de uma gaiola de Faraday (1,0 x 0,6 x 0,7 m). O cabo de registro foi conectado ao micro conector fixado ao animal e, após um período de habituação de 30 min, iniciou-se o registro eletrográfico basal de 20 min seguido pelos tratamentos.



Figura 12 - Ambiente experimental (interior da gaiola de Faraday) para registro do EEG (foto do autor).

3.3.2.3 Registro extracelular in vitro

Registros eletrofisiológicos foram realizados em fatias parasagitais do hipocampo (400 μm de espessura) de ratos *Wistar* machos. Animais foram anestesiados com isoflurano, decapitados e o cérebro colocado em fluido cefalorraquidiano artificial (aCSF) resfriado e oxigenado (5 % CO_2 95 % O_2), contendo (em mM) NaCl, 124; KCl, 3; NaHCO_3 , 26; NaH_2PO_4 , 1.25; MgSO_4 , 10; Glicose, 10; CaCl_2 , 1. Fatias foram cortadas usando um vibrátomo (Leica® *Biosystems*, VT1000S). O hipocampo foi dissecado, permanecendo em repouso por, pelo menos, 2 h em aCSF oxigenado, mantendo em temperatura

ambiente. Ato contínuo, algumas fatias foram posicionadas em uma câmara com interface umidificada à temperatura de 30° C, sendo continuamente perfundidas por aCSF (2 ml/min) com (em mM) NaCl, 124; KCl, 3; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; MgSO₄ 1, glicose, 10; CaCl₂ 2. Técnicas de registro extracelular padrão foram empregadas para monitorar as respostas de campo emitidas na região CA1 do hipocampo (Bortolotto et al., 2001).

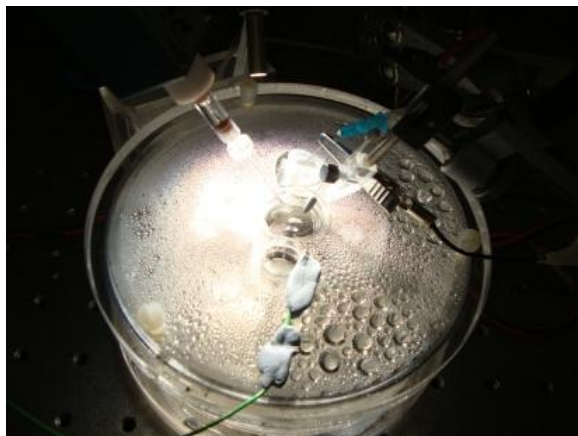


Figura 13 – Câmara de registro extracelular (foto do autor).

Os estímulos foram liberados por um eletrodo de estímulo (0,033 Hz). A decaída (*slope*) dos potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (PPSEs) foram mensurados e expressos em relação ao registro de base (*baseline*). As respostas durante o registro de base foram ajustadas para aproximadamente 50 % da resposta máxima obtida. Os efeitos da estimulação de alta frequência (*HFS*, estimulação de 100 Hz, 1 s) foram mensurados em períodos (média durante 2 min) após a indução da potenciação de longo prazo (*LTP*). Os resultados obtidos correspondem aos dados de uma fatia de hipocampo por rato. Os registros foram realizados utilizando um amplificador *Axoclamp 2A* (*Axon Instruments*, Foster City, CA), sendo monitorados e analisados pelo programa *WinLTP* versão 1.11 (Anderson e Collingridge, 2001, disponível em <http://www.winltp.com>).

3.3.3 Ensaios bioquímicos

3.3.3.1 Obtenção do material biológico

Para a mensuração de corticosterona e de ACTH, os animais foram alojados em uma sala com isolamento acústico e, após 24 h de habituação, anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano e decapitados com uma guilhotina. O sangue foi coletado do tronco do animal e armazenado em tubos refrigerados contendo 50 µl de EDTA (0,5 M; pH 7,4) e 50 µl de aprotinina (5.000 KIU/ml, *Trasyol*; Bayer, EDTA, Newbury, UK). Em seguida, o plasma foi centrifugado, separado e armazenado a -80° C até o período de mensuração da corticosterona e do ACTH.

Para a realização dos experimentos de *Western blot* ou a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase, os animais foram anestesiados em uma câmara saturada com éter e decapitados com uma guilhotina para a coleta de tecido cerebral, imediatamente após o término dos testes comportamentais. Os encéfalos removidos foram lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) resfriada à 4° C e, imediatamente após, dissecados sobre uma placa de Petri sobreposta em gelo seco. Os hipocampos e a porção pré-frontal do córtex foram depositados em eppendorfs® siliconizados e armazenados em *freezer* à -80° C até o período da utilização para cada ensaio planejado.

3.3.3.2 Dosagem plasmática de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)

Os níveis de corticosterona plasmática foram mensurados por radioimunoensaio, usando diluição 1:100 em um tampão de citrato (pH 3,0) para desnaturar a globulina ligante conforme descrito por (Spiga et al., 2011). O antisoro foi gentilmente cedido pelo Prof. Gabor Makara (Instituto de Medicina Experimental, Budapest, Hungria) e a corticosterona [¹²⁵I] comprada da Izotop® (Budapest, Hungria). Os coeficientes de variação do ensaio de corticosterona foram de 14,1 % (intra-ensaios) e 15,3 % (inter-ensaios) respectivamente. O ACTH plasmático foi mensurado usando 100 µl plasma e reagentes (*DiaSorin*, Stillwater, MN), conforme o protocolo estipulado pelo fabricante. Os coeficientes de variação do ensaio de ACTH foram de 2,2 % (intra-ensaios) e 7,8 % (inter-ensaios) respectivamente.

3.3.3.3 Determinação da Concentração de Proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi utilizada para a realização dos ensaios da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e para o *Western blot*. A quantificação de proteína foi feita pelo método de Lowry (1951). Resumidamente, 4,9 ml de reativo A (Na_2CO_3 2 % em NaOH 0,1N) foram misturados a 0,1 ml de reativo B, que consiste na união de duas partes iguais de solução de tartarato de sódio e potássio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2 % e solução alcalina de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 %, formando desta maneira o reativo C (reativo A + reativo B). Um volume de 200 μl de reativo C foi adicionado a 20 μl de cada amostra e estas foram incubadas durante 10 min. Em seguida, foi acrescentado o reagente de titulação FOLIN-Ciocalteu Fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído duas vezes em água destilada a fim de conseguir uma solução final de 1 N. As amostras foram novamente incubadas, durante 20 min em ambiente escuro. Em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. A curva padrão (0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mg/ml) foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque de albumina bovina fração V (10 mg/ml) (pH 7,0) (AppliChem, St. Louis, MO, EUA).

3.3.3.4 Determinação da atividade da enzima de acetilcolinesterase (AChE)

As amostras de hipocampo e córtex pré-frontal foram homogeneizadas 1:10 (w/v) em HEPES 20 mM, tampão pH 7,4. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 3.000 g à 4° C por 5 min e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade de AChE. A concentração de proteínas foi mensurada conforme o item 3.3.3.3 anteriormente descrito. A determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi estimada pelo método descrito por Ellman e colaboradores (1961), utilizando o iodeto de acetilcolina como substrato. A taxa de hidrólise deste composto é medida através da liberação de compostos tióis que, quando reagem com o ditiobisnitrobenzoato (DTNB), produzem um composto colorido denominado ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (TNB), lido em um espectrofotômetro (TECAN® – Infinit M200) no comprimento de onda de 412 nm. As amostras foram retiradas de diferentes animais e avaliadas em duplicata.

3.3.3.5 Imunodeteção de proteínas por *Western blot*

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

Os experimentos de *Western blot* foram realizados conforme descrito por Dutra (2012). Os extratos dos tecidos previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (5,56 mg/ml), foram misturados em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β-mercaptoetanol 15 %, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6 %, azul de bromofenol 0,3 %, glicerol 25 %) e fervidas por 5 min a 100° C. Quantidades iguais de proteínas para cada amostra (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8-12 %). A etapa seguinte consistiu na transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1 h. Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e Tween 0,05 % em água destilada) contendo leite desnatado (5 %) por, no mínimo, 1 h, à temperatura ambiente. Após a lavagem em TBS-T (4 vezes), as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para cada anticorpo primário contra as seguintes proteínas de interesse para o estudo: anti-β-actina (#3700, 1:500, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA), anti-proteína c-FOS (#sc52, 1:1000, Santa Cruz *Biotech Inc*, CA, EUA), anti-proteína NMDAR1 (#4204, 1:1000, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA) e anti-proteína NMDAR2B (#MAB5220, 1:1000, *EMD Millipore Corporation*, Billerica, MA, EUA). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas em TBS- T (4 vezes) e incubadas

com anticorpo secundário específico (coelho, #7074, ou camundongo, #7076) conjugado à peroxidase (1:25.000, *Cell Signaling Technology*, Danvers, MA, EUA) durante 2 h à temperatura ambiente. Os imunocomplexos foram visualizados usando o sistema de detecção de substrato quimioluminescente *SuperSignal West Femto* (*Thermo Fischer Scientific*, Rockford, IL, EUA) e filme radiográfico (*Hyperfilm ECL*, *GE Healthcare*, São Paulo, SP, Brasil), segundo as recomendações do fabricante. Os valores densitométricos foram normalizados utilizando como controle as bandas imunorreativas contra o anticorpo anti- β -actina. Os filmes foram digitalizados e os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa NIH *ImageJ* 1.36B (NIH, Bethesda, MD, USA) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias em relação a β -actina.

3.4 DROGAS, INJEÇÕES E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

Todas as drogas foram dissolvidas em salina (0,9 %) e injetadas em um volume de 1 ml/kg. As doses utilizadas para a realização deste trabalho foram baseadas na literatura ou em padronizações prévias do laboratório (Cavalli et al., 2009; Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2013; Duzzioni et al., 2008; Hoeller et al., 2011; Pellow e File, 1987).

- Solução Salina (NaCl 0,9 %) - Sigma-Adrich Co., St. Louis, MO, EUA. Injetada via intraperitoneal para o tratamento dos grupos controle;
- Hidrocloreto de Pilocarpina (agonista muscarínico não-seletivo) – Sigma-Adrich Co., St. Louis, MO, EUA. Injetado via intraperitoneal nas doses de 20, 150 e 350 mg/kg.
- Brometo de Metil-escopolamina (antagonista muscarínico que não cruza a barreira hemato-encefálica) – RBI, EUA. Injetado via subcutânea na dose de 1 mg/kg.
- Hidrocloreto de Pentilenotetrazol (antagonista do receptor GABA-A) - Sigma-Adrich Co., St. Louis, MO, EUA. Injetado via intraperitoneal na dose de 15 mg/kg.
- Diazepam (agonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA-A) – Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brasil. Injetado via intraperitoneal na dose de 15 mg/kg.
- Cloridrato de Memantina (antagonista do receptor NMDA) – Ebix®, Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Frankfurt, Alemanha. Injetado via intraperitoneal na dose de 4 mg/kg.

Todos os animais utilizados nesse estudo foram tratados com metil-escopolamina (1 mg/kg, s.c.) 30 min antes da injeção de pilocarpina, ou salina (NaCl 0,9 %), com o intuito de prevenir os efeitos colinomiméticos periféricos (figura 14).

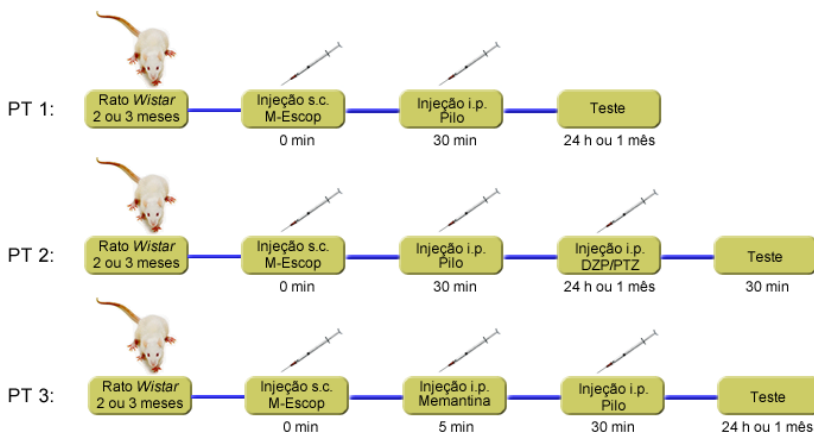


Figura 14 – Esquema representativo do protocolo de tratamento adotado ao longo do estudo. Ratos avaliados 24 h após a administração de pilocarpina foram tratados com 3 meses de idade, enquanto ratos avaliados 1 mês após a administração de pilocarpina foram tratados com 2 meses de idade. O protocolo de tratamento diferiu conforme o desenho experimental, sendo o período de “teste” caracterizado pelas diferentes técnicas abordadas nesse trabalho (e.g. comportamento, eletrofisiologia, bioquímica). Abreviações: PT, protocolo experimental; M-Escop, metil-escopolamina (1 mg/kg); Pilo, pilocarpina (20, 150 ou 350 mg/kg); DZP, diazepam (1 mg/kg); PTZ, pentilenotetrazol (15 mg/kg); Memantina (4 mg/kg); s.c., injeção subcutânea; i.p., injeção intraperitoneal.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados dos testes comportamentais (labirinto em cruz elevado e medo condicionado ao contexto), análises quantitativas do EEG e parâmetros bioquímicos foram expressos como média \pm E.P.M. e avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls para múltiplas comparações, tendo como variáveis independentes os fatores “pré-tratamento” e/ou “tratamento”. Foram utilizados para as análises estatísticas e confecção dos gráficos os programas *Statistica*® versão 8.0 (StaSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e *GraphPad Prism*® versão 5.0

(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Uma análise espectral de tempo-frequência utilizando a transformada de *wavelet* foi realizada nos traçados de EEG para avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos em ratos registrados 24 h ou 1 mês após as injeções de salina ou pilocarpina. Frequências entre 3 e 30 Hz foram analisadas em períodos de 10 segundos (30 amostras selecionadas durante o período de 1 h, em momentos em que o animal mostrava-se imóvel). Nesses períodos, o valor das frequências mais proeminentes foi calculado (F1, a frequência com a potência mais elevada - $\mu V^2/Hz$ – presente em pelo menos 30 % do período selecionado). A análise de *wavelet* foi conduzida nos sinais de EEG exportados do programa de aquisição *ACQKnowledge*® versão 3.3 (BIOPAC Systems, Inc., EUA) para uma rotina de Matlab® versão 6.5 R13 (Mathworks Inc., MA, EUA) (Romcy-Pereira et al., 2008; Rossetti et al., 2006; Rossetti et al., 2012).

4 RESULTADOS

4.1 Perfil ansiogênico de ratos tratados com doses subconvulsivantes de pilocarpina: abordagem comportamental e eletrofisiológica

Conforme demonstrado na figura 15A, ratos foram tratados com doses subconvulsivantes de pilocarpina e avaliados no labirinto em cruz elevado 1 mês após o tratamento. ANOVA de uma via dos dados obtidos revelou que a administração de pilocarpina nas doses de 150 ou 350 mg/kg, mas não 20 mg/kg, reduziu significativamente o tempo gasto [$F(3,53)=14,09$; $p<0,01$] e o número de entradas nos braços abertos [$F(3,53)=16,04$; $p<0,01$], assim como o número de imersões desprotegidas de cabeça [$F(3,53)=7,22$; $p<0,01$] e a exploração na região distal dos braços abertos [$F(3,53)=29,55$; $p<0,01$] do labirinto, além de aumentar o número de estiramentos corporais protegidos [$F(3,53)=19,39$; $p<0,01$] quando comparado ao grupo controle (figura 15B). O número de entradas nos braços fechados (figura 15B) e de levantamentos (dados não mostrados) não foi alterado pelo tratamento.

Não foram observadas alterações comportamentais ou anormalidades no EEG de ratos tratados com a menor dose de pilocarpina (20 mg/kg). A dose de 150 mg/kg de pilocarpina promoveu leve salivação e piloereção após a injeção, havendo o desaparecimento gradativo destes efeitos após 30-45 min, caracterizando então um comportamento indistinguível do observado nos animais controle (tratados com salina). O padrão eletrográfico induzido pela pilocarpina nas doses de 20 ou 150 mg/kg foi composto por atividade cortical dessincronizada e maior incidência de ritmo teta hipocampal, durante grande parte do experimento. Imediatamente após a injeção da maior dose de pilocarpina (350 mg/kg), os animais apresentaram acinesia, marcha atáxica, movimentos de automatismos da boca, autolimpeza, maior atividade das vibrissas e salivação. Esses sintomas persistiram por até 1 h após o tratamento, desaparecendo gradativamente nas 2 h seguintes. Os traçados eletrográficos mostraram maior atividade teta no hipocampo, associada a descargas com espículas isoladas que se disseminaram progressivamente para a área cortical. A atividade no EEG com ondas de grande amplitude no hipocampo e córtex tornaram-se sincronizadas, com o aparecimento de *bursts* intermitentes de grande amplitude e eventos com poli espículas durante grande parte do registro (figura 16).

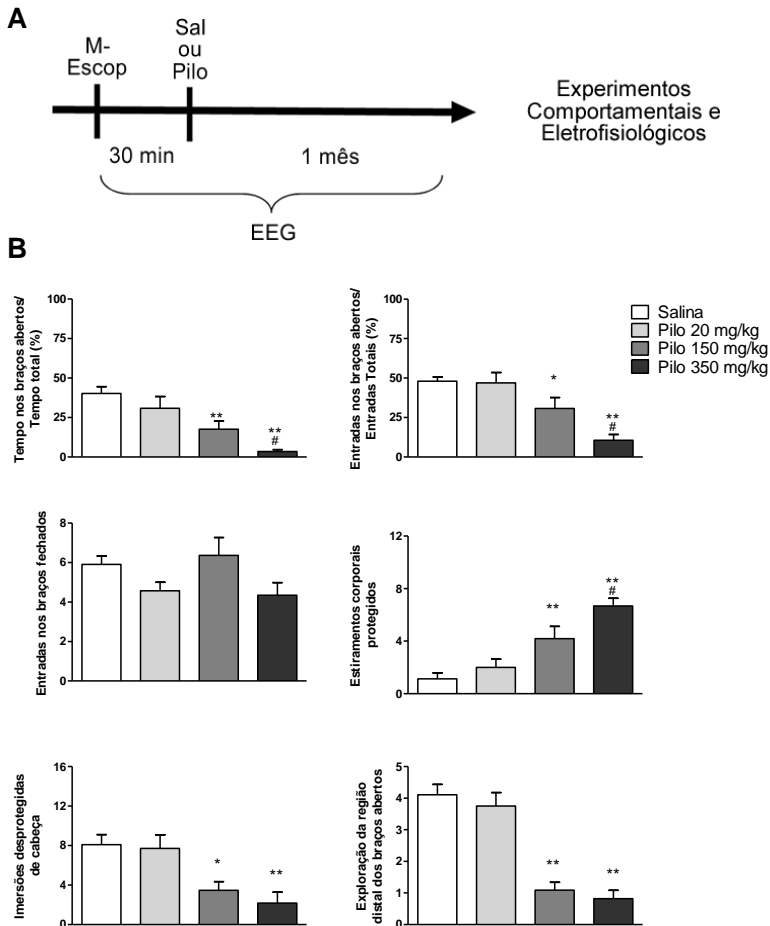


Figura 15 – Efeitos da administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina em ratos avaliados 1 mês após o tratamento no labirinto em cruz elevado. A) Desenho experimental do protocolo de tratamento: M-Escop, metil-escopolamina (1 mg/kg); Sal, salina (0,9 %); Pilo, pilocarpina (20, 150 ou 350 mg/kg). B) Efeitos da pilocarpina sobre o comportamento de ratos avaliados no labirinto em cruz elevado um mês após a administração da droga. Valores são representados pela média \pm E.P.M. ($n=11-17$ animais/grupo) * $p<0,05$ ou ** $p<0,001$ em relação ao grupo controle (salina) e # $p<0,05$ em relação ao grupo Pilo 150 mg/kg. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Embora os animais tratados com a maior dose de pilocarpina (350 mg/kg) tenham apresentado crises eletrográficas típicas no EEG, nenhum deles desenvolveu *status epilepticus* ou crises recorrentes espontâneas durante o período em que foram avaliados. Um mês após o tratamento, apenas os animais injetados com a maior dose de pilocarpina apresentaram descargas com espículas de grande amplitude nos traçados de EEG (figura 16), sem a associação com comportamentos comuns às crises epiléticas (*e.g.* crises mioclônicas, espasmos) durante as inspeções visuais diárias, observando-se um perfil comportamental inalterado (*e.g.* comportamentos exploratórios, autolimpeza, levantamentos e atividades locomotoras). Em contraste, animais tratados com a dose intermediária de pilocarpina (150 mg/kg) não apresentaram alterações de ordem epilética nos traçados de EEG (figura 16).

A análise quantitativa do EEG revelou, conforme a ANOVA de uma via, que ambas as doses de pilocarpina (150 ou 350 mg/kg) aumentaram a incidência de atividade teta (oscilação F1) no hipocampo [$F(2,357)=35,22$; $p<0,0001$], quando comparadas aos animais controle (injetados com salina) e entre os grupos tratados com pilocarpina. Nenhuma diferença foi observada durante análise quantitativa dos registros da região cortical (figura 17A e B). De forma conjunta, esses dados iniciais demonstram que a administração de uma dose subconvulsiva de pilocarpina (150 mg/kg) promove alterações efetivas na circuitaria neuronal de ratos, independentemente da incidência de atividade epilética eletrográfica, com uma maior incidência de atividade teta, um fator determinante da função hipocampal sobre o controle dos estados de ansiedade.

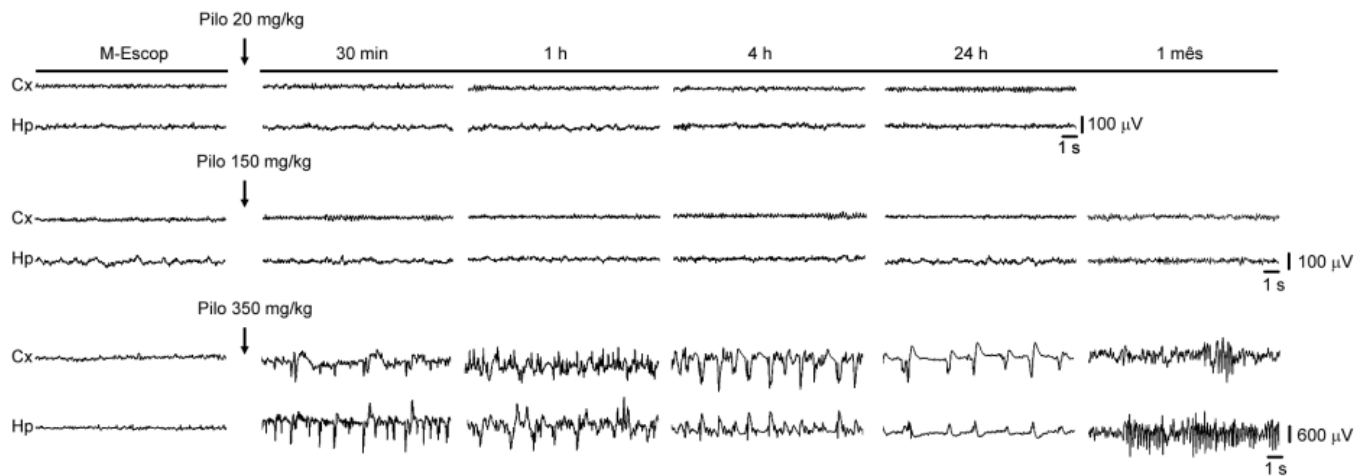


Figura 16 – Efeitos de doses ansiogênicas de pilocarpina sobre a atividade eletroencefalográfica (EEG) de ratos. (n=3-4 animais/grupo). Registros representativos (épocas de 8 s) da região cortical (Cx) e hipocampal (Hp).

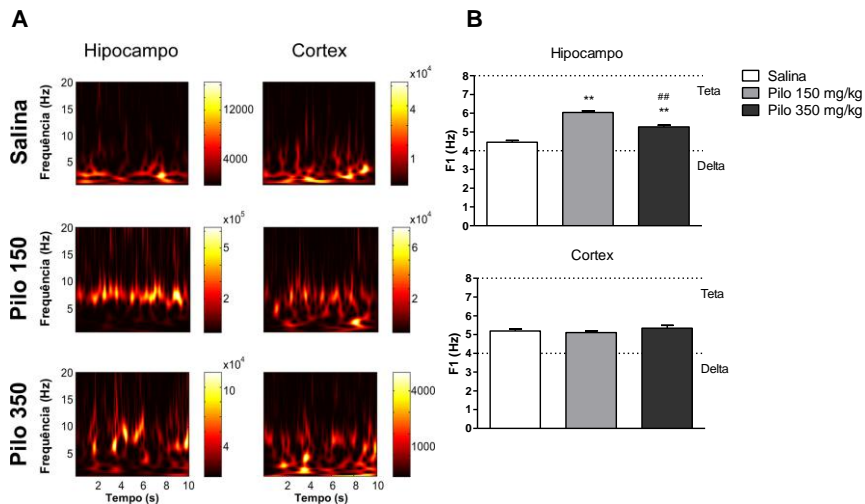


Figura 17 – Atividade teta hipocampal observada 1 mês após a administração de doses ansiogênicas de pilocarpina. A) Análise de *wavelet* representativa da atividade eletrográfica do hipocampo e córtex em períodos selecionados durante o estado de vigília imóvel, sem a presença de atividade epiléptica. B) Quantificação das frequências mais proeminentes (F1) durante registros do hipocampo e córtex de ratos tratados com pilocarpina (150 ou 350 mg/kg). Cores quentes correspondem às intensidades com maior valor em cada frequência. Valores são representados pela média \pm E.P.M. (n=3-4 animais/grupo). **p<0,0001 em relação ao grupo controle (salina) e ##p<0,0001 em relação ao grupo Pilo 150 mg/kg. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

4.2 Envolvimento do receptor GABA-A nas respostas ansiogênicas de ratos tratados com pilocarpina

A sensibilidade de ratos tratados com uma dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/kg) foi avaliada a partir da administração de uma droga-padrão ansiolítica (diazepam) ou ansiogênica (pentilenotetrazol). As figuras 18 e 19 apresentam os efeitos agudos promovidos por uma única injeção de diazepam ou pentilenotetrazol sobre parâmetros comportamentais clássicos e etológicos de ratos avaliados no labirinto em cruz elevado 24 h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina (ver protocolo de tratamento nas figuras 18A e 19A). Conforme mostrado pela ANOVA de duas vias,

tendo como fatores as variáveis “pré-tratamento (PT)” e “tratamento (T)”, a injeção de diazepam, como esperado, aumentou o tempo gasto nos braços abertos do aparato, enquanto o pentilenotetrazol diminuiu o tempo deste parâmetro em ratos previamente tratados com salina 24 h [T:F(2,42)=59,52; $p<0,000001$; PTxT:F(2,42)=9,37; $p<0,001$] e 1 mês [PT:F(1,42)=6,69; $p<0,05$; T:F(2,42)=26,58; $p<0,000001$; PTxT:F(2,42)=6,18; $p<0,01$] após o tratamento. Além disso, a injeção de pentilenotetrazol diminuiu os números de entradas nos braços abertos 24 h [T:F(2,42)=15,43; $p<0,00001$; PTxT:F(2,42)=3,25; $p<0,05$], entradas nos braços fechados 24 h [T:F(2,42)=5,17; $p<0,01$] e o comportamento de imersões de cabeça desprotegidas 24 h [T:F(2,42)=27,56; $p<0,000001$] após o tratamento. A injeção de diazepam aumentou o número de imersões de cabeça desprotegidas 1 mês após [PT:F(1,42)=6,34; $p<0,05$; T:F(2,42)=19,58; $p<0,000001$; PTxT:F(2,42)=4,42; $p<0,05$], além de aumentar o número de vezes em que a região distal dos braços abertos foi explorada enquanto o pentilenotetrazol reduziu este parâmetro 24 h [T:F(2,42)=59,24; $p<0,000001$; PTxT:F(2,42)=11,01; $p<0,001$] e 1 mês [PT:F(1,42)=11,41; $p<0,001$; T:F(2,42)=24,80; $p<0,000001$; PTxT:F(2,42)=5,77; $p<0,01$] após a injeção de salina (figuras 18 e 19).

A injeção de salina em ratos pré-tratados com pilocarpina diminuiu o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos 24 h e 1 mês [T:F(2,42)=16,28; $p<0,00001$; PTxT:F(2,42)=4,01; $p<0,05$] após o tratamento, assim como o comportamento de imersões de cabeça e a exploração da região distal dos braços abertos, além de ter aumentado o número de estiramentos corporais protegidos 24 h [PT:F(1,42)=7,57; $p<0,01$; T:F(2,42)=8,19; $p<0,001$; PTxT:F(2,42)=3,65; $p<0,05$] e 1 mês [PT:F(1,42)=22,22; $p<0,0001$; T:F(2,42)=8,85; $p<0,001$] após o tratamento quando comparado ao grupo controle. Além disso, ratos pré-tratados com pilocarpina não apresentaram diferenças no número de entradas nos braços fechados do labirinto (figuras 18 e 19).

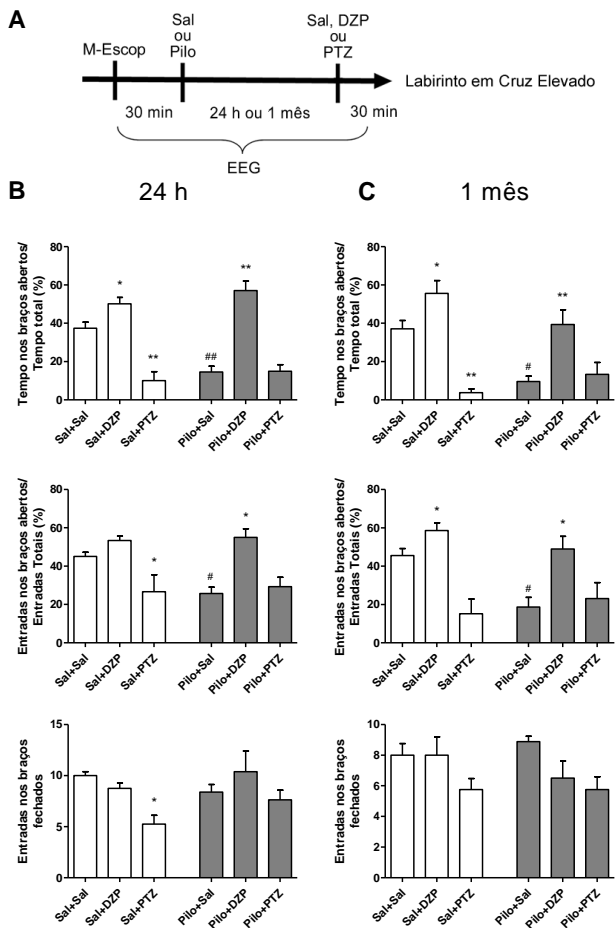


Figura 18 – Avaliação de parâmetros comportamentais clássicos de ratos pré-tratados com uma dose ansiogênica de pilocarpina e posteriormente tratados com uma droga-padrão ansiolítica ou ansiogênica. A) Desenho experimental do protocolo de tratamento: M-Escop, metil-escopolamina (1 mg/kg); Sal, salina (0,9 %); Pilo, pilocarpina (150 mg/kg); DZP, diazepam (1 mg/kg); PTZ, pentilenotetrazol, 15 mg/kg). B-C) Efeitos da injeção de diazepam ou pentilenotetrazol 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os valores são representados pela média \pm E.P.M. (n=8 animais/grupo). * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (injetados com salina). # $p < 0,05$ ou ## $p < 0,001$ em relação ao grupo salina (injetado com salina). Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

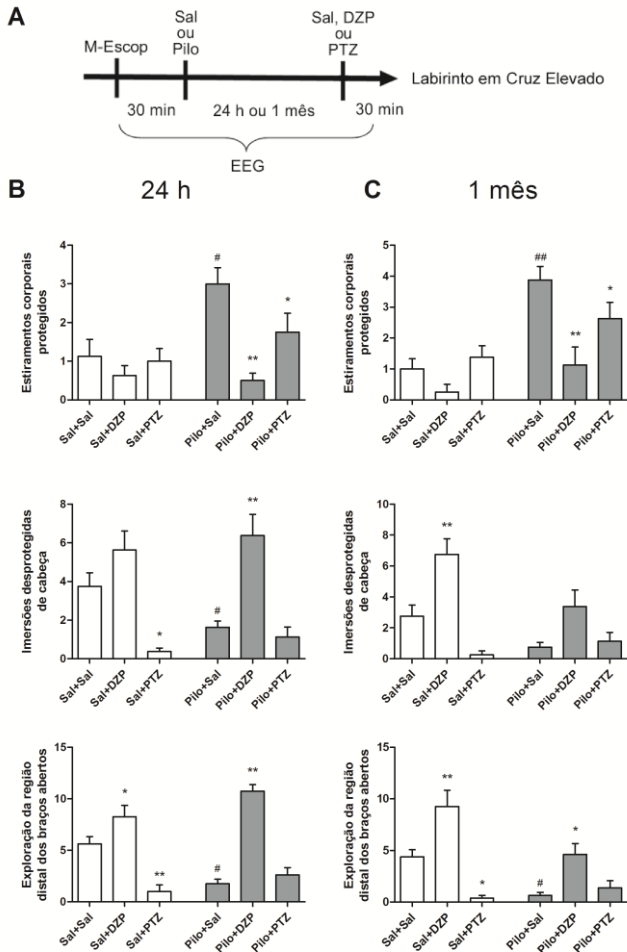


Figura 19 - Avaliação de parâmetros comportamentais etológicos de ratos pré-tratados com uma dose ansiogênica de pilocarpina e posteriormente tratados com uma droga-padrão ansiolítica ou ansiogênica. A) Desenho experimental do protocolo de tratamento: M-Escop, metil-escopolamina (1 mg/kg); Sal, salina (0,9 %); Pilo, pilocarpina (150 mg/kg); DZP, diazepam (1 mg/kg); PTZ, pentilenotetrazol, 15 mg/kg). B-C) Efeitos da injeção de diazepam ou pentilenotetrazol 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado. Valores são representados pela média \pm E.P.M. ($n=8$ animais/grupo). * $p<0,05$ ou ** $p\leq 0,001$ em relação ao grupo controle (injetado com salina). Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Quando administrada 24 h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina, a injeção de diazepam reverteu o efeito ansiogênico promovido pela pilocarpina nos seguintes parâmetros: tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos, diminuição do comportamento de estiramento corporal e aumento do comportamento de imersão de cabeça e número de explorações na região distal dos braços abertos, quando comparados aos ratos injetados com salina após o tratamento com pilocarpina (figuras 18 e 19). A administração de pentilenotetrazol em ratos tratados com pilocarpina apenas diminuiu o número de estiramentos corporais. Além disso, as injeções de diazepam ou pentilenotetrazol em ratos tratados com pilocarpina não alteraram o número de entradas nos braços fechados do labirinto (figuras 18 e 19).

Conforme observado na tabela 1, a injeção de pilocarpina *per se*, assim como o tratamento com diazepam ou pentilenotetrazol, não alterou a atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal e hipocampo 24 h ou 1 mês após o tratamento com o agonista colinérgico, indicando a ausência de correlação entre a atividade colinérgica nessas estruturas e as respostas ansiogênicas observadas nos testes comportamentais e eletrofisiológicos.

Tabela 1 – Efeitos do tratamento com diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) ou pentilenotetrazol (PTZ, 15 mg/kg, i.p.) 24 h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina (Pilo, 150 mg/kg, i.p.), sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE, nmol/min/mg de proteína) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos.

Tratamentos	Hipocampo		Córtex	
	24 horas	1 mês	24 horas	1 mês
Sal+Sal	5,78±0,35	2,98±0,51	2,98±0,51	2,80±0,58
Pilo+Sal	5,87±0,29	5,53±0,19	3,11±0,61	2,06±0,44
Sal+Dzp	7,06±0,86	6,09±0,46	4,00±0,85	3,85±0,91
Pilo+Dzp	6,12±0,50	5,85±0,34	3,74±0,60	2,11±0,43
Sal+Ptz	7,40±0,39	6,72±0,26	2,98±0,61	3,04±0,59
Pilo+Ptz	6,33±0,56	5,61±0,21	3,55±0,50	2,40±0,57

Valores são expressos como média ± E.P.M. (n=8 animais/grupo).

Conforme ilustrado na figura 20, os registros basais do EEG da região do córtex pré-frontal e hipocampo foram realizados previamente às injeções, não havendo qualquer anormalidade no traçado após a administração de metil-escopolamina (dados não mostrados), ou da

injeção de salina em ratos pré-tratados com salina e registrados 24 h ou 1 mês após os tratamentos (figura 20A). Conforme também observado previamente (figura 16), não foram notadas atividades de ordem epileptogênica (e.g. descargas ponta-onda ou poli espículas) após a injeção de pilocarpina (150 mg/kg), havendo predominância de atividades rápidas e de baixa amplitude tanto no córtex pré-frontal como nas regiões do hipocampo.

A injeção de pentilenotetrazol em ratos pré-tratados com salina ou pilocarpina induziu rapidamente um efeito hipo-responsivo sobre o comportamento (e.g. imobilidade), associado a descargas de baixa frequência e grande amplitude no hipocampo e córtex (figura 20). Embora sejam observadas atividades de ordem epileptogênica durante os registros de EEG, esses eventos não foram associados com comportamentos convulsivos, uma vez que não foram observadas manifestações motoras generalizadas ou mioclonias em nenhum dos grupos avaliados. Além disso, a injeção de diazepam promoveu poucas alterações no EEG, havendo maior incidência de ondas lentas tanto 24 h quanto 1 mês após os tratamentos (figura 20).

Com intuito de visualizar e quantificar as frequências cerebrais incidentes após o tratamento com pilocarpina e as drogas com propriedades ansiolíticas ou ansiogênicas, foi conduzida a análise de *wavelet* nos traçados eletrográficos obtidos. Conforme se observa na figura 21 (A-C), a análise de *wavelet* mostra uma visão representativa do EEG hipocampal e cortical após a injeção de diazepam ou pentilenotetrazol em ratos pré-tratados com salina ou pilocarpina. Embora a injeção de pentilenotetrazol não tenha promovido comportamentos de ordem epileptogênica, a incidência de descargas de grande amplitude com baixas frequências no EEG hipocampal foi observada quando a droga foi injetada 24 h ou 1 mês após em ratos pré-tratados com salina ou pilocarpina (figura 21A-C). A análise quantitativa do EEG revelou que ratos tratados com pilocarpina apresentam um aumento significativo na incidência de atividade teta (4-8 Hz, oscilação F1) no hipocampo 24 h [PT:F(1,654)=15,72; $p < 0,0001$; T:F(2,654)=80,29; $p < 0,000001$; PTxT:F(2,654)=3,93; $p < 0,05$] e 1 mês [PT:F(1,684)=11,59; T:F(2,684)=6,90; $p < 0,01$; PTxT:F(2,684)=41,90; $p < 0,000001$] após os tratamentos e no córtex pré-frontal 24 h [PT:F(1,654)=8,58; $p < 0,01$; PTxT:F(2,654)=11,96; $p < 0,00001$] e 1 mês [PT:F(1,684)=16,21; $p < 0,0001$; T:F(2,684)=15,42; $p < 0,000001$; PTxT:F(2,684)=11,72; $p < 0,00001$] após os tratamentos (figura 21D).

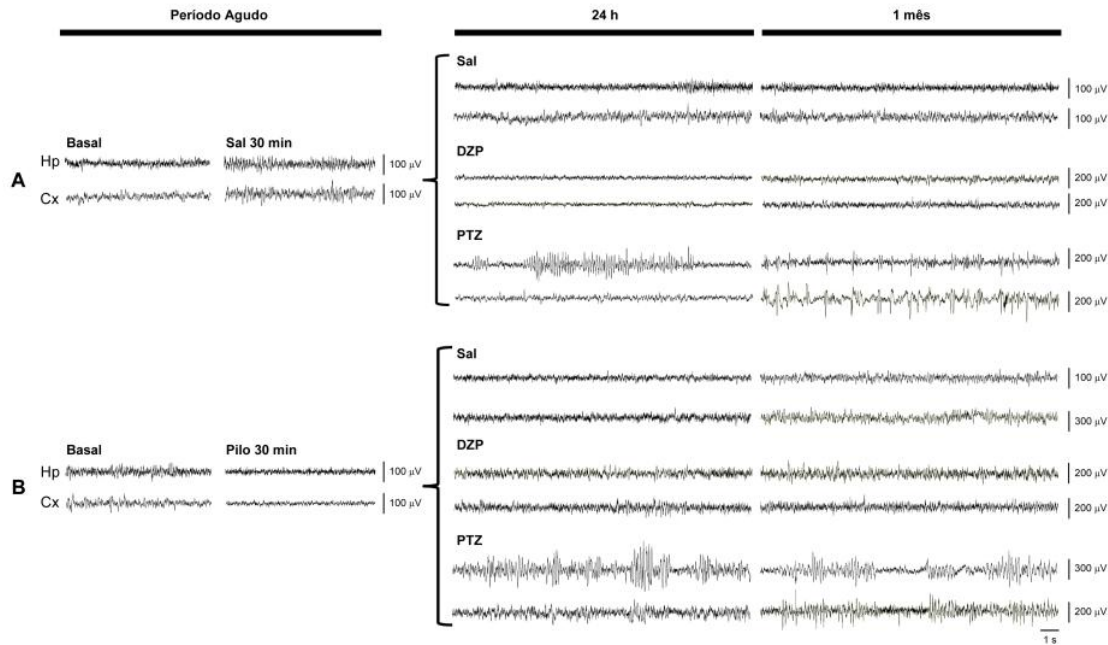


Figura 20 – Atividade eletroencefalográfica (EEG) após a administração de diazepam (DZP, 1 mg/kg) ou pentilenotetrazol (PTZ, 15 mg/kg) em ratos registrados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina (Sal, 0,9 %) ou pilocarpina (Pilo, 150 mg/kg). Registros representativos (períodos de 15 a 25 s) da região cortical (Cx) e hipocampal (Hp, n=8 animais/grupo).

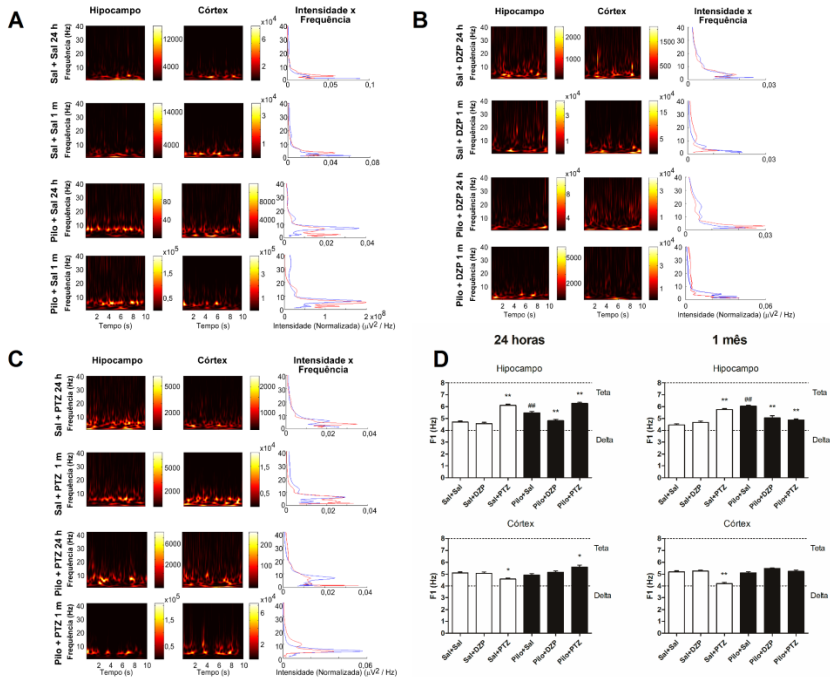


Figura 21 – Incidência de atividade teta hipocampal após a administração de diazepam ou pentilenotetrazol em ratos registrados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina. A) Análise de *wavelet* representativa da atividade eletrográfica do hipocampo e córtex durante o estado de imobilidade. Cores quentes correspondem às intensidades com maior valor em cada frequência. B) Quantificação das frequências mais proeminentes (F1) durante registros do hipocampo e córtex após a administração de diazepam ou pentilenotetrazol em ratos 24 horas ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina (150 mg/kg). Valores são representados pela média \pm E.P.M. (n=3-4 animais/grupo). * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (injeção de salina em ambos os grupos) e ### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo (injeção de salina) em animais pré-tratados com salina. Todas comparações foram feitas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

A injeção de diazepam não alterou *per se* a incidência de atividade teta no hipocampo ou córtex em ratos pré-tratados com salina, mas diminuiu o ritmo teta hipocampal 24 h e 1 mês após o tratamento com pilocarpina quando comparado ao grupo controle. A injeção de pentilenotetrazol aumentou significativamente a incidência de atividade teta hipocampal em animais pré-tratados com salina, apresentando um efeito bifásico naqueles pré-tratados com pilocarpina (aumentou 24 h após, mas diminuiu 1 mês após o tratamento). Além disso, o ritmo teta da região cortical diminuiu pela administração de pentilenotetrazol em ratos pré-tratados com salina e aumentou 24 h após o tratamento com pilocarpina (figura 21D).

4.3 Respostas de medo condicionado em ratos tratados com pilocarpina e avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual (CAC)

Os efeitos de uma única administração de pilocarpina (150 mg/kg) sobre a aquisição de memória aversiva contextual são representados na figura 22 (ver representação esquemática do procedimento experimental abaixo). Conforme ANOVA de medidas repetidas (R1), não há diferença entre os grupos tratados na duração do comportamento de congelamento durante o período de teste (24 h após o tratamento), embora este comportamento esteja significativamente reduzido durante o período de re-teste [$R1:F(1,22)=24,40; p<0,0001$] 1 mês após o tratamento (figura 22A). De forma similar, a ANOVA de uma via não revelou diferenças no comportamento de congelamento de ratos tratados com pilocarpina, submetidos, 24 h após, ao processo de condicionamento aversivo e testados 1 mês após o tratamento (figura 22B).

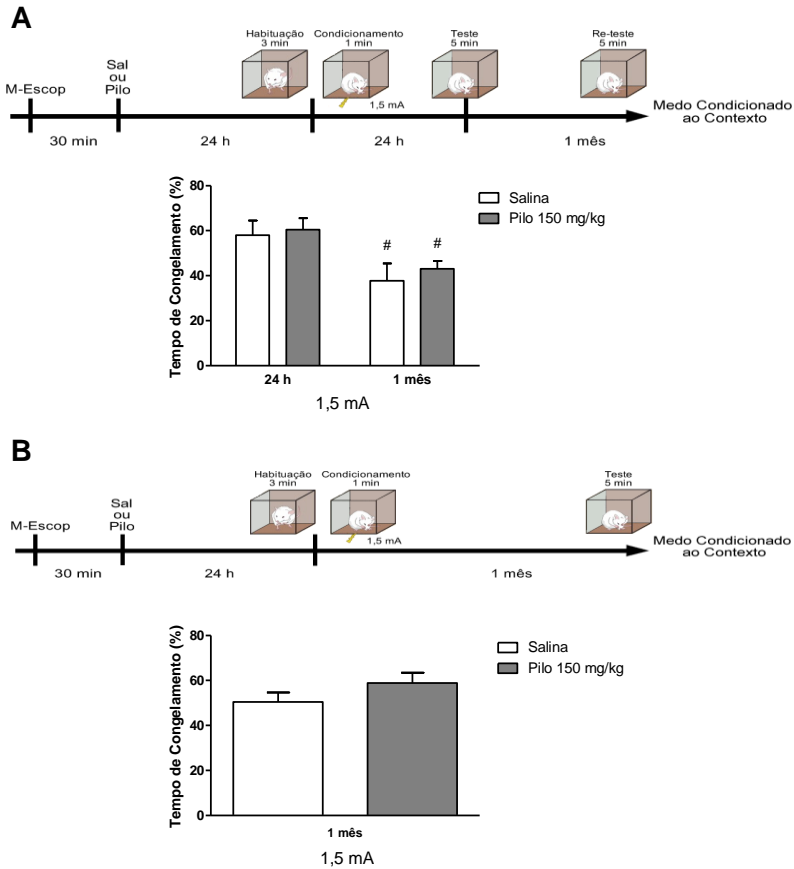


Figura 22 – Comportamento de ratos submetidos ao teste de condicionamento aversivo contextual após a administração de pilocarpina. A) Procedimentos comportamentais de aquisição (habituação de 3 min + estímulo com choque, 1,5 mA / 1 s. Animais foram submetidos ao teste 24 h após o condicionamento, com duração de 5 min, e re-teste 1 mês após o condicionamento. B) Animais foram submetidos ao teste 1 mês após o condicionamento, com duração de 5 min. Os valores são representados pela média \pm E.P.M. de tempo de congelamento expresso pelos ratos. (n=12 animais/grupo). #p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle (injetado com salina ou pilocarpina). Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

4.4 Efeitos sobre a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina: registros *in vitro*

Conforme o teste de ANOVA, não foi possível observar diferenças estatísticas entre potenciais sinápticos excitatórios de fatias de hipocampo da região CA1 de ratos tratados com uma dose ansiogênica de pilocarpina (150 mg/kg) em relação ao grupo controle, assim como não houveram diferenças dos potenciais evocados após a indução de potenciação de longa duração (LTP) por um estímulo tetânico, indicando que a pilocarpina não é capaz de alterar mecanismos celulares da região CA1 do hipocampo envolvidos na formação da memória (figura 23).

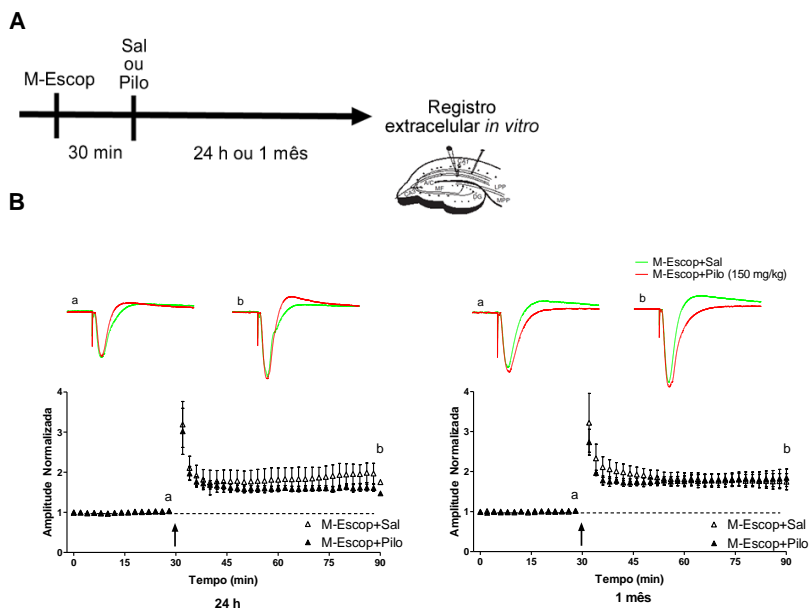


Figura 23 - Efeitos da injeção de pilocarpina sobre a plasticidade sináptica em fatias do hipocampo. Ratos foram sacrificados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina. Traçados na porção superior do gráfico representam as respostas de potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo extraído no período indicado (a, basal; b, após estimulação de alta frequência). A seta indica o período em que o estímulo tetânico (100 Hz, 1 s) é aplicado. Valores são representados pela média \pm E.P.M. (n=5 animais/grupo). Abreviações: M-Escop, metil-escopolamina; Sal, salina; Pilo, pilocarpina (150 mg/kg).

4.5 Envolvimento do eixo HPA nas respostas ansiogênicas de ratos tratados com pilocarpina

Dando continuidade à caracterização das respostas ansiogênicas promovidas pela pilocarpina e sua provável relação com a indução de estresse e modulação do eixo HPA, ratos foram tratados com o intuito de quantificar os níveis plasmáticos de corticosterona e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, ver protocolo de tratamento na figura 15A). Conforme análise do teste t, a administração de pilocarpina aumentou significativamente os níveis de corticosterona plasmática 24 h após a administração da droga ($t(9)=3,43$; $p<0,01$), persistindo este efeito até 1 mês após o tratamento ($t(6)=2,91$; $p<0,05$) quando relacionado ao grupo controle (figura 24B). A administração de pilocarpina promoveu o aumento dos níveis plasmáticos do hormônio ACTH 24 h após a injeção da droga ($t(9)=2,58$; $p<0,05$) em relação aos animais tratados com salina, mas esta resposta não foi observada 1 mês após o tratamento (figura 24C).

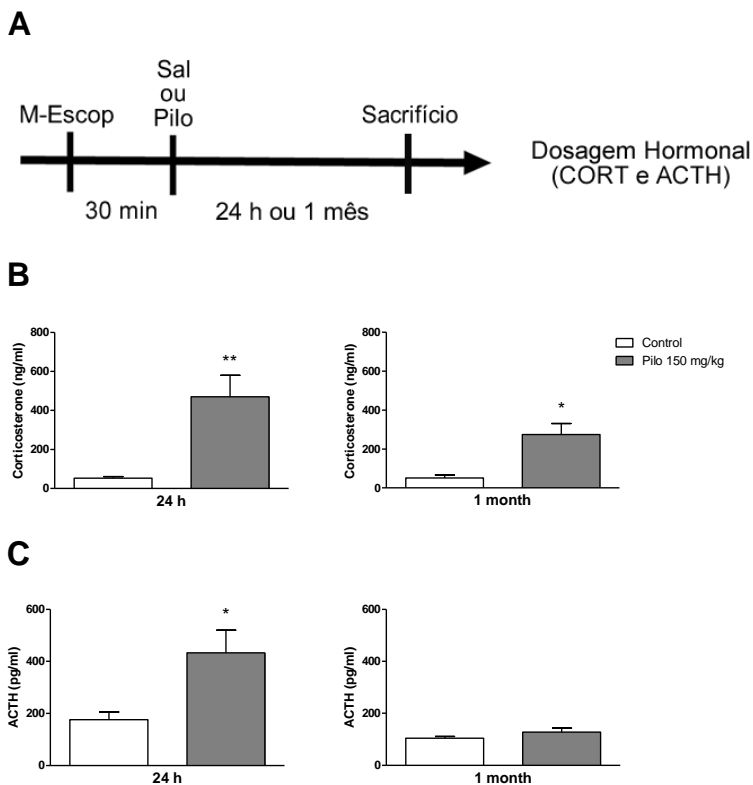
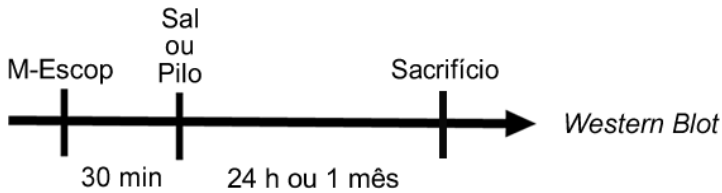


Figura 24 – Efeitos da pilocarpina sobre os níveis plasmáticos de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico. A) Ratos foram sacrificados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina. B) Efeitos da injeção de pilocarpina (150 mg/kg) sobre a concentração de corticosterona plasmática (ng/ml) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) plasmático (pg/ml). Os valores são representados pela média \pm E.P.M. ($n=3-6$ animais/grupo). * $p<0,05$ ou ** $p<0,001$ em relação ao grupo salina. Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Com intuito de investigar o possível aumento na atividade celular de estruturas límbicas envolvidas na modulação de respostas de ansiedade, foi avaliado, pela análise de teste *t*, os efeitos da pilocarpina sobre a expressão da proteína FOS no hipocampo de ratos através da técnica de *Western blot*. Conforme demonstrado na figura 25, a administração de pilocarpina não altera a expressão dessa proteína no tecido hipocampal 24 h após o tratamento. Contudo, os níveis dessa

proteína encontram-se aumentados de maneira significativa 1 mês após a única injeção de pilocarpina ($t(28)=2,16$; $p<0,05$), quando comparado ao grupo controle (figura 25B).

A



B

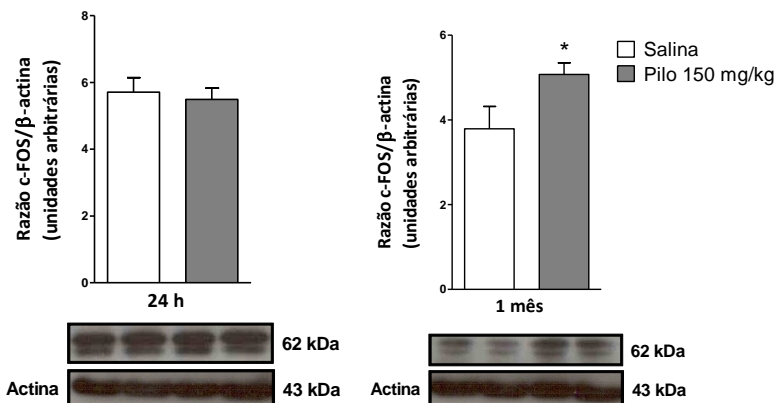


Figura 25 – Efeitos administração de pilocarpina na expressão de proteína FOS no hipocampo de ratos. A) Ratos foram sacrificados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina. B) O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do *Western blot* para a proteína FOS, corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina. Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *Western blot* são expressas para a proteína FOS (62 KDa) e para o controle genômico β-actina (43 KDa). Os valores são representados pela média ± E.P.M. ($n=4-6$ animais/grupo). * $p<0,05$ em relação ao grupo especificado. Todas as comparações foram realizadas pelo teste t de *Student*.

4.6 Participação de receptores do tipo NMDA nas respostas ansiogênicas de ratos tratados com pilocarpina

Levando em consideração o envolvimento de receptores do tipo NMDA na excitabilidade neuronal e, conseqüentemente, nos processos emocionais e cognitivos, ratos foram pré-tratados com o antagonista do receptor NMDA memantina, associado a uma dose subconvulsiva de pilocarpina, e avaliados no labirinto em cruz elevado 24 h ou 1 mês após o tratamento. Conforme esperado, animais tratados com metil-escopolamina e pilocarpina mostraram um perfil ansiogênico nos parâmetros comportamentais clássicos e etológicos quando avaliados no labirinto em cruz elevado, com redução do tempo gasto 24 h [PT:F(1,28)=7,01; $p<0,05$; PTxT:F(1,28)=6,17; $p<0,05$] e 1 mês após [T:F(1,28)=13,4; $p<0,01$], número de entradas nos braços abertos 24 h [PT:F(1,28)=5,35; $p<0,05$; T:F(1,28)=5,17; $p<0,05$; PTxT:F(1,28)=6,49; $p<0,05$] e 1 mês após [T:F(1,28)=18,47; $p<0,001$] e o número de explorações na região distal dos braços abertos do labirinto 1 mês após [T:F(1,28)=13,02; $p<0,01$], assim como um aumento do comportamento de estiramentos corporais 1 mês após os tratamentos [T:F(1,28)=10,76; $p<0,01$] (figuras 26 e 27).

De forma oposta, o pré-tratamento com memantina nos animais que receberam pilocarpina bloqueou os efeitos ansiogênicos quando comparados aos ratos avaliados 24 h ou 1 mês após o pré-tratamento com metil-escopolamina e pilocarpina, enquanto animais que receberam memantina e salina mostraram desempenho similar aos animais controle, injetados com metil-escopolamina e salina (figuras 26 e 27).

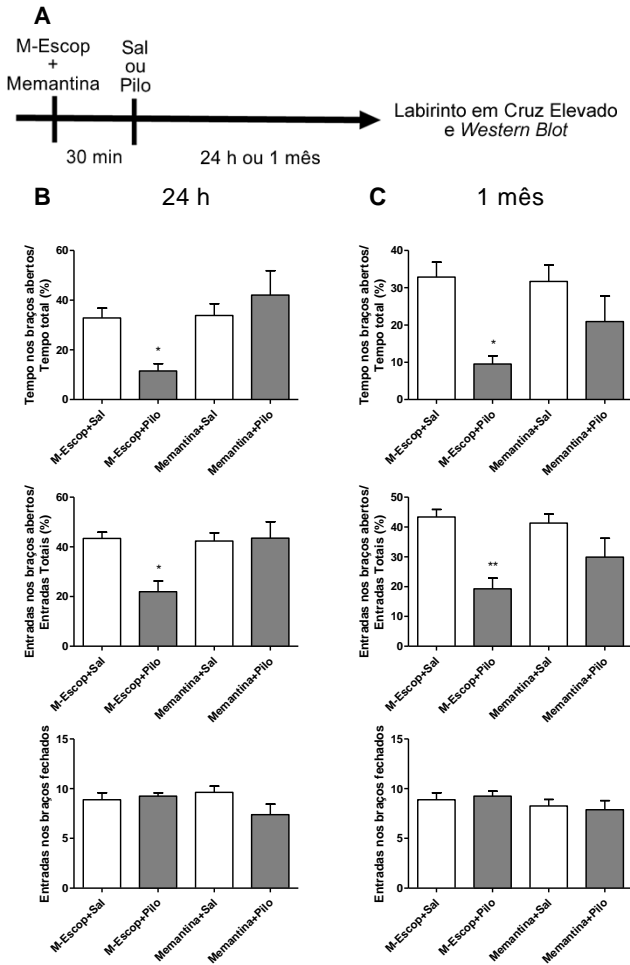


Figura 26 – Avaliação de parâmetros comportamentais clássicos de ratos tratados com o antagonista do receptor NMDA memantina e uma dose ansiogênica de pilocarpina. A) Desenho experimental do protocolo de tratamento: M-Escop, metil-escopolamina (1 mg/kg); Memantina (4 mg/kg); Sal, salina (0,9 %); Pilo, pilocarpina (150 mg/kg). B-C) Efeitos do pré-tratamento com memantina em ratos tratados com salina ou pilocarpina e avaliados 24 h ou 1 mês após no labirinto em cruz elevado. Valores são representados pela média \pm E.P.M. (n=8 animais/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (metil-escopolamina e salina). Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

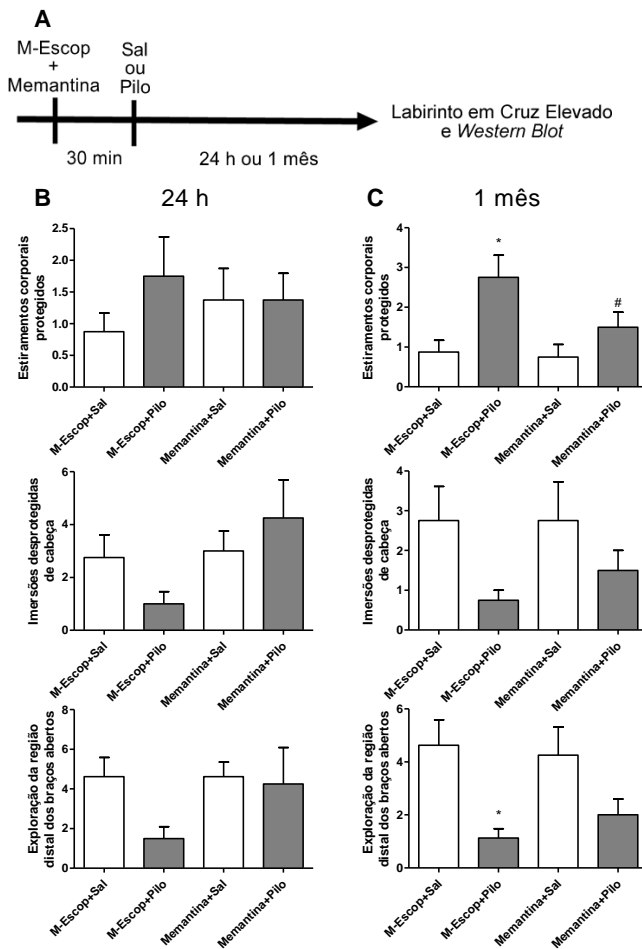


Figura 27 – Avaliação de parâmetros comportamentais etológicos de ratos tratados com o antagonista do receptor NMDA memantina e uma dose ansiogênica de pilocarpina. A) Desenho experimental do protocolo de tratamento: M-Escop, metil-escopolamina (1 mg/kg); Memantina (4 mg/kg); Sal, salina (0,9 %); Pilo, pilocarpina (150 mg/kg). B-C) Efeitos do pré-tratamento com memantina em ratos tratados com salina ou pilocarpina e avaliados 24 h ou 1 mês após no labirinto em cruz elevado. Valores são representados pela média \pm E.P.M. ($n=8$ animais/grupo). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (com metil-escopolamina e salina). Todas as comparações foram realizadas por ANOVA seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Objetivando elucidar de maneira mais concreta a participação dos receptores do tipo NMDA nas respostas ansiogênicas observadas em ratos tratados com pilocarpina, animais foram tratados e o nível de expressão das duas principais subunidades excitatórias do receptor NMDA foram avaliadas: as subunidades NMDAR1 e NMDAR2B. De maneira relevante, o tratamento com pilocarpina diminuiu significativamente a expressão da subunidade NMDAR1 tanto 24 h ($t(31)=5,20$; $p<0,0001$) quanto 1 mês ($t(28)=3,45$; $p<0,01$) após a administração da droga, conforme análise pelo teste t (figura 28).

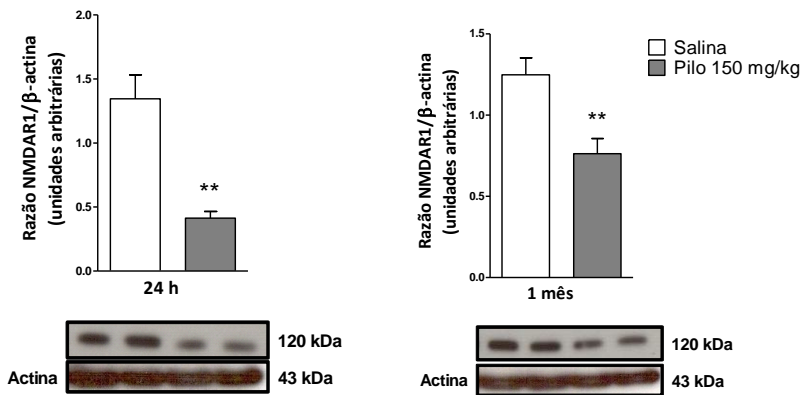


Figura 28 – Efeitos da pilocarpina na expressão da subunidade NMDAR1 no hipocampo de ratos após o tratamento. Os animais foram sacrificados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina. O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do *Western blot* para o receptor NMDAR1, corrigidos pelo valor do controle genômico β -actina. Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *Western blot* são expressas para o receptor NMDAR1 (120 KDa) e para o controle genômico β -actina (43 kDa). Os valores são representados pela média \pm E.P.M. ($n=4-6$ animais/grupo). ** $p<0,001$ em relação ao grupo especificado. Todas as comparações foram realizadas pelo teste t de *Student*.

Ademais, a análise por teste t revelou que o tratamento com pilocarpina também foi capaz de induzir a diminuição da expressão da subunidade NMDAR2B 24 h ($t(31)=3,10$; $p<0,01$), resultado este que não foi observado 1 mês após a administração da droga (figura 29).

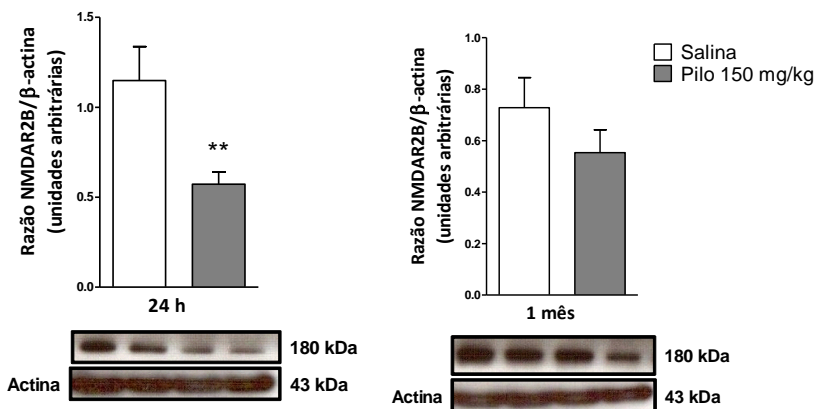


Figura 29 – Efeitos da pilocarpina na expressão da subunidade NMDAR2B no hipocampo de ratos após o tratamento. Os animais foram sacrificados 24 h ou 1 mês após o tratamento com salina ou pilocarpina. O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do *Western blot* para o receptor NMDAR2B, corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina. Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *Western blot* são expressas para o receptor NMDAR2B (180 KDa) e para o controle genômico β-actina (43 kDa). Os valores são representados pela média ± E.P.M. (n=4-6 animais/grupo). **p<0,001 em relação ao grupo especificado. Todas as comparações foram realizadas pelo teste *t* de Student.

5 DISCUSSÃO

O quadro abaixo representa o resumo dos principais resultados encontrados no presente estudo e que serão discutidos ao longo dessa seção:

Quadro 4 – Principais resultados obtidos nos diferentes testes empregados na investigação das respostas ansiogênicas promovidas por diferentes doses de pilocarpina.

Teste	Tratamento	Período	
		24 h	1 mês
Ansiedade (LCE)	Pilo 150 mg/kg	↑	↑
	Pilo 350 mg/kg	↑	↑
	Pilo 150 mg/kg + DZP 1 mg/kg	↓	↓
	Pilo 150 mg/kg + PTZ 15 mg/kg	n.s.	n.s.
	Memantina 4 mg/kg + Pilo 150 mg/kg	n.s.	n.s.
Atividade Epiléptica (EEG)	Pilo 150 mg/kg	n.s.	n.s.
	Pilo 350 mg/kg	↑	↑
	Pilo 150 mg/kg + DZP 1 mg/kg	n.s.	n.s.
	Pilo 150 mg/kg + PTZ 15 mg/kg	↑	↑
Atividade Epiléptica (comportamento)	Pilo 150 mg/kg	n.s.	n.s.
	Pilo 350 mg/kg	n.s.	n.s.
Ritmo teta hipocampal (EEG)	Pilo 150 mg/kg	↑	↑
	Pilo 350 mg/kg	-	↑
	Pilo 150 mg/kg + DZP 1 mg/kg	↓	↓
	Pilo 150 mg/kg + PTZ 15 mg/kg	↑	↓
Medo Condicionado (CAC)	Pilo 150 mg/kg	n.s.	n.s.
Marcadores Bioquímicos	AChE	n.s.	n.s.
	CORT	↑	↑
	ACTH	↑	n.s.
Expressão Proteica	c-FOS	n.s.	↑
	NMDAR1	↓	↓
	NMDAR2B	↓	n.s.
Plasticidade Sináptica (LTP)	Pilo 150 mg/kg	n.s.	n.s.

Abreviações: ↑, aumento; ↓, diminuição; n.s., alterações não significantes; -, teste não realizado.

Ao longo das últimas décadas, um relativo avanço nas pesquisas científicas sobre os conceitos terapêuticos dos transtornos de ansiedade tem permitido um melhor entendimento dos mecanismos neurobiológicos dessas doenças (Farach et al., 2012). Apesar do quadro

evolutivo observado no último meio século, novas abordagens ainda são necessárias, levando em consideração a resistência de alguns transtornos às terapias atualmente empregadas, assim como seus efeitos colaterais, e tendo em vista que um terço dos pacientes tratados na clínica não atinge uma remissão sustentada dos sintomas da ansiedade (Pollack et al., 2008). Diversos estudos pré-clínicos têm evidenciado o papel do sistema colinérgico sobre a regulação de estruturas límbicas e as diferentes respostas comportamentais envolvidas nos estados de medo e ansiedade (Acquas et al., 1996; Degroot e Treit, 2003; Graef et al., 2011). Neste contexto, o grupo de pesquisa em Neurofarmacologia da UFSC tem recentemente investigado os efeitos a curto e longo prazo causados pela administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina - um agonista dos receptores muscarínicos colinérgicos - em ratos avaliados em diferentes testes comportamentais (Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2013; Hoeller et al., 2011; Hoeller et al., 2013a; Hoeller et al., 2013b).

No presente estudo observamos que ratos tratados com uma única injeção sistêmica de pilocarpina (150 ou 350 mg/kg, mas não 20 mg/kg) e que não apresentaram comportamentos convulsivos após a injeção (*e.g.* mioclonias ou crises generalizadas) reduziram significativamente o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, além de alterar alguns comportamentos relacionados à avaliação de risco (*i.e.* aumento do número de estiramentos corporais desprotegidos e diminuição das imersões desprotegidas de cabeça e exploração da região distal dos braços abertos), quando comparados aos animais controle, apresentando um perfil do tipo-ansio gênico, quando avaliados 24 h ou 1 mês após o tratamento. Não foram detectadas quaisquer alterações locomotoras nos animais avaliados, uma vez que o número de entradas nos braços fechados do labirinto - um parâmetro vinculado à mobilidade (Cruz et al., 1994; Rodgers e Johnson, 1995) - assim como o número total de quadrantes cruzados no teste do campo aberto (dados não mostrados, Hall, 1936; Ramos et al., 1997) não apresentaram diferenças dos valores observados no grupo controle.

Esses achados vão ao encontro de dados recentes do nosso grupo de pesquisa que relatam um efeito ansio gênico duradouro (de até 3 meses) promovido pela administração de pilocarpina (150 mg/kg) em ratos (Duarte et al., 2010). Além disso, a inativação temporária da fimbria-fórnix - a principal via eferente hipocampal para a área septal e diencefálica (Swanson et al., 1987) - promoveu *per se* um efeito do tipo-ansiolítico - sugerindo um controle tônico desta via na modulação de

comportamentos relacionados à ansiedade - e atenuou o perfil do tipo-ansiosgênico de animais avaliados 1 mês após a injeção de pilocarpina (Duarte et al., 2010). Respostas ansiosgênicas também foram observadas quando os ratos foram avaliados em diferentes testes de ansiedade/medo incondicionada/o como o labirinto em T e o campo aberto, um mês após a administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina (Duarte et al., 2013).

Embora a maior dose empregada de pilocarpina (350 mg/kg) não tenha promovido atividade convulsiva em 35 % dos animais tratados, fenômeno este já relatado anteriormente (Cavalheiro et al., 1991; Covolan e Mello, 2000; De-Mello et al., 2005), foi possível observar alterações comportamentais como imobilidade, marcha atáxica, automatismos e salivação excessiva nos primeiros minutos após a injeção sistêmica, havendo persistência desses sintomas por aproximadamente 1 h. Além disso, observou-se durante os registros de EEG a presença de descargas ictais de grande amplitude na região do hipocampo que, progressivamente estenderam-se para o córtex frontal, tornando-se sincronizadas e intermitentes durante horas. Mesmo não havendo incidência de *status epilepticus* ou crises espontâneas recorrentes nos animais tratados, crises eletrográficas nos traçados de EEG com grande incidência de descargas do tipo ponta-onda foram registradas até 1 mês após a injeção da dose elevada de pilocarpina. A mesma dose (350 mg/kg) também foi capaz de reduzir a captação de L-[³H]-glutamato e viabilidade celular em fatias de hipocampo 1 mês após o tratamento (Duarte et al., 2013), evidenciando que além de estarem associados a eventos ictais – conforme observado durante os registros de EEG - os efeitos ansiosgênicos observados nesses animais poderiam ser resultantes de lesões hipocâmpais, de maneira oposta a animais que também apresentaram o mesmo perfil ansiosgênico após o tratamento com uma dose menor (150 mg/kg) de pilocarpina, mas que não desenvolveram características epileptogênicas. Nesse sentido, nossos resultados mostram que a administração de uma dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/kg) pode promover alterações efetivas de longo prazo na circuitaria neuronal de ratos, independente de atividade epiléptica eletrográfica, sugerindo esta preparação experimental como de grande potencial na investigação do traço de ansiedade.

Apesar da existência de poucos trabalhos acerca do papel dos receptores muscarínicos nas respostas e regulação dos transtornos de ansiedade, dados da literatura confirmam nossos achados. Wall e colegas (2001) mostraram que o aumento da transmissão colinérgica na

região infra límbica do córtex pré-frontal medial induz respostas de ansiedade, como observamos, e melhora a memória de trabalho em camundongos, como relatado por De Mello e colegas (2005) em ratos. Além disso, a injeção de pirenzepina (um antagonista do subtipo M1 do receptor muscarínico) promoveu respostas ansiolíticas enquanto o McN-A-343 (um agonista do subtipo M1 do receptor muscarínico) apresentou respostas ansiogênicas, sugerindo que a atividade colinérgica no córtex pré-frontal medial e no prosencéfalo (especialmente pela mediação do subtipo M1 dos receptores muscarínicos) pode exercer funções relevantes na regulação da ansiedade (Wall et al., 2001).

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente empregado em experimentos de *screening* de drogas (Pellow, 1985; Pellow e File, 1986) e no estudo de mecanismos celulares envolvidos nos fenômenos de medo e ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005; File et al., 1998; Jinks e McGregor, 1997; Lacroix et al., 2000). Nesse teste, drogas que aumentam a neurotransmissão inibitória (*e.g.* GABAérgica) estão propensas a aumentar o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos do labirinto (Cruz et al., 1994; Pellow e File, 1986), enquanto drogas que diminuem a transmissão inibitória reduzem o tempo gasto nos braços abertos (Cruz et al., 1994; File e Lister, 1984; Jung et al., 2002; Pellow e File, 1986). Além disso, o bloqueio ou estimulação de receptores GABAérgicos é uma ferramenta validada na investigação de respostas ansiogênicas ou ansiolíticas em modelos experimentais de ansiedade, *e.g.* tratamentos com pentilenotetrazol (Cavalli et al., 2009; Jung et al., 2002) ou diazepam (Duarte et al., 2008; Griebel et al., 1999; Mohler, 2006), respectivamente.

Por outro lado, vários pesquisadores têm investigado a relação entre a ativação de receptores muscarínicos e o ritmo teta em estruturas límbicas que recebem aferências colinérgicas (Richter et al., 1999). O ritmo teta está envolvido em diversas funções fisiológicas como o aprendizado, memória, atenção e plasticidade neural (Klimesch, 1999; Quintero et al., 1985; Vertes, 2005). Gray e McNaughton propuseram que o ritmo teta no sistema septo-hipocampal está envolvido na modulação dos estados de ansiedade, sendo que lesões desse sistema ou a administração de drogas ansiolíticas nessa área inibe a atividade teta hipocampal de ratos (Gray e McNaughton, 2000; Gray e McNaughton, 1983). No presente estudo, nós demonstramos que o tratamento com pilocarpina (150 ou 350 mg/kg) aumentou a incidência de oscilações na frequência teta (F1) na região hipocampal tanto 24 h quanto 1 mês após o tratamento quando comparado aos registros do grupo controle. Nossos

resultados mostram que, na verdade, a oscilação aumentada na banda teta foi mais evidente em ratos tratados com a dose de 150 mg/kg do que 350 mg/kg, sugerindo que eventos epiléticos observados após o tratamento com a maior dose de pilocarpina podem modificar diferentemente a função septo-hipocampal, alterando, conseqüentemente, a atividade teta e a regulação dos estados de ansiedade.

Em consonância com os nossos resultados, uma sincronização temporal aumentada desse ritmo é também observada em pacientes com epilepsia do lobo temporal (Babiloni et al., 2009), estando relacionada a respostas de medo (Lesting et al., 2011) e ansiedade (Adhikari et al., 2010; Adhikari et al., 2011). Estes achados apontam para um papel importante na sincronia da atividade teta na modulação dessas comorbidades. Informações sobre o padrão eletrográfico (ritmo teta) de neurônios diretamente ligados à modulação dos estados de ansiedade poderiam melhor evidenciar o papel do sistema colinérgico no controle das respostas emocionais observadas em roedores, uma vez que o ritmo teta hipocampal, modulado por vias colinérgicas, exerce funções de “marca-passo” sobre o sistema septo-hipocampal no controle da ansiedade (Gray e McNoughton, 2000). Nesse sentido, é possível sugerir a partir dos nossos dados que as alterações temporárias no ritmo hipocampal desencadeadas pela administração de pilocarpina podem estar envolvidas nas respostas ansiogênicas, assemelhando-se às respostas observadas em humanos que relatam “sensações de ansiedade” durante uma “ameaça” e que, conseqüentemente, apresentam um aumento da atividade teta hipocampal durante este estímulo (Cornwell et al., 2012).

Algumas hipóteses levantadas em relação à função do complexo receptor GABA-A/sítio benzodiazepínico nos transtornos de ansiedade tem acentuado que mudanças na conformação deste receptor ou alterações da concentração ou propriedades de um ligante endógeno, poderiam contribuir para os sintomas patológicos da ansiedade (Charney, 2003). Conforme relatado previamente, os receptores GABAérgicos estão intimamente envolvidos nos transtornos de ansiedade em função das propriedades ansiolíticas e ansiogênicas de moduladores do sítio benzodiazepínico, havendo uma redução da sensibilidade desse sítio a agonistas benzodiazepínicos em pacientes com transtornos de ansiedade (Gray e McNoughton, 2000; Nutt et al., 1990; Roy-Byrne et al., 1996). A administração oral (Woods et al., 1991) ou intravenosa (Nutt et al., 1990) de flumazenil – um antagonista

do sítio benzodiazepínico do receptor GABA-A (Duarte et al., 2008) – promove ataques de pânico e aumenta a ansiedade antecipatória em alguns pacientes com diagnóstico de transtorno de pânico, mas não em indivíduos saudáveis. Além disso, a sensibilidade aos efeitos do diazepam na velocidade dos movimentos sacádicos – deslocamento frequente dos olhos para o controle ocular fino (Zwanzger et al., 2012) – é reduzida de forma anormal, implicando que a sensibilidade funcional do complexo receptor GABA-A/sítio benzodiazepínico está atenuada em regiões que controlam os movimentos sacádicos, tais como o córtex frontal, os colículos superiores, cerebelo e a formação reticular do tronco encefálico (Roy-Byrne et al., 1996).

Com intuito de investigar a participação do complexo GABA-A/benzodiazepínico no perfil ansiogênico promovido pela pilocarpina, investigamos o comportamento de ratos tratados com uma dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/kg) e testados 24 h ou 1 mês após no labirinto em cruz elevado imediatamente após novo tratamento com uma droga-padrão ansiolítica [diazepam, um agonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA-A (Little, 1991)] ou ansiogênica [pentilenotetrazol, um antagonista do receptor GABA-A (Jung et al., 2002)]. A administração de diazepam inibiu o efeito ansiogênico da pilocarpina tanto nos animais avaliados 24 h como 1 mês após o tratamento, revertendo a redução no número de entradas, no tempo de permanência dos ratos nos braços abertos do labirinto, e a incidência de comportamentos relacionados à avaliação de risco. Em contrapartida, o tratamento com PTZ 24 h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina não modificou o perfil comportamental de ratos testados no labirinto em cruz elevado, talvez pela promoção de uma resposta ansiogênica máxima ou uma resposta falso-negativa associada à atividade ictal presente em animais que receberam uma dose subconvulsivante de pilocarpina e tratados 24 h ou um mês após com PTZ.

Ao contrário do observado após a administração de uma dose ansiogênica de pilocarpina, a administração de PTZ *per se* rapidamente promoveu descargas de grande amplitude nos primeiros minutos após a injeção durante o registro da atividade eletrográfica (EEG) do hipocampo e córtex pré-frontal, sugerindo que as respostas ligadas à ansiedade observadas em ratos tratados com pilocarpina são independentes de atividade epiléptica eletrográfica, ao contrário de modelos de abrasamento (*kindling*) ou PTZ (em doses epileptogênicas baixas ou elevadas) que são frequentemente empregados no estudo de

transtornos emocionais em animais (Adamec, 1990; Adamec e Morgan, 1994; Cavalli et al., 2009; Cruz et al., 1994).

Ao quantificar as frequências predominantes nos traçados de EEG após a administração de drogas que modulam o receptor GABA-A, observamos que a atividade teta não foi modificada após a injeção de diazepam em ratos pré-tratados com salina, em divergência com estudos pioneiros nessa área que reportam os efeitos de várias drogas ansiolíticas na diminuição da atividade teta hipocampal (Gray et al., 1975; McNaughton e Sedgwick, 1978; Mellanby et al., 1981; Quintero et al., 1985). Nossos achados podem ser devido ao fato da análise da atividade teta ter sido feita durante um estado comportamental de alerta imóvel, que também favorece a diminuição desse ritmo em ratos injetados com salina. Por outro lado, a injeção de diazepam diminuiu significativamente a atividade teta hipocampal de ratos registrados 24 h ou 1 mês após o tratamento com pilocarpina. Além disso, a injeção de PTZ aumentou a atividade teta no hipocampo em ratos pré-tratados com salina ou pilocarpina, enquanto efeitos contrastantes foram observados em registros da região cortical (*i.e.* diminuição e aumento dessa atividade em ratos tratados com salina e pilocarpina, respectivamente).

Pouco é conhecido sobre os efeitos causados por antagonistas do receptor GABA-A na atividade teta de ratos, embora a administração de GF 7142 – um agonista parcial inverso do sítio benzodiazepínico do receptor GABA-A – aumente a oscilação teta de neurônios do septo e do hipocampo (Hajós et al., 2004), enquanto o bloqueio dos receptores GABA-A e GABA-B facilitem a atividade teta induzida por carbacol – um agonista do receptor colinérgico muscarínico (Konopacki et al., 1997). Nesse sentido, confirmamos a importância dos receptores GABAérgicos na regulação dessa rede neural. Essa regulação se dá possivelmente através de interneurônios inibitórios que atuam sobre as oscilações teta (Buzsáki et al., 1983; Leung, 1998; Leung e Shen, 2007) e sua importante interação com neurônios colinérgicos (muscarínicos) envolvidos na gênese do ritmo teta.

A respeito da atividade colinérgica, a acetilcolinesterase (AChE) tem um importante papel na regulação da concentração de acetilcolina nas sinapses (Soreq e Seidman, 2001; Zimmerman e Soreq, 2006). A avaliação clínica de indivíduos ansiosos mostrou que a atividade sérica de AChE é inversamente correlacionada com a ansiedade traço, mas não com a ansiedade estado, sugerindo uma função preditiva da atividade sérica de AChE na ansiedade traço (Sklan et al., 2004). Desta forma, seus níveis podem ser usados para o entendimento

dos comportamentos relacionados à ansiedade em modelos animais (Dori et al., 2011). Assim, a mensuração da atividade de AChE no hipocampo e córtex pré-frontal foi realizada com intuito de detectar alterações na concentração dessa enzima nessas estruturas vitais na regulação da ansiedade. No entanto, nenhuma alteração foi encontrada 24 h ou um mês após o tratamento com pilocarpina. Em relação aos nossos resultados, a avaliação da atividade de AChE no hipocampo e córtex parece não ser vinculadas ao perfil ansiogênico promovido pela pilocarpina. Em contraste, Schetinger e colaboradores (2000) mostraram que a atividade de AChE no córtex cerebral de ratos está diminuída após a administração de diazepam, enquanto níveis aumentados dessa atividade no hipocampo foram observados após a administração de FG 7142 em camundongos (Appleyard et al., 1990). Nesse sentido, é possível que o protocolo experimental utilizado em nosso estudo não seja sensível à análise da atividade de AChE ou que as respostas ansiogênicas induzidas pela administração de pilocarpina possam ser independentes dessa atividade no hipocampo ou córtex pré-frontal. A este respeito, a injeção intra-septal da imunotoxina colinérgica 192-IgG-saporina diminuiu a atividade de AChE no hipocampo, septo e córtex frontal sem alterar o comportamento de ratos avaliados no labirinto em cruz elevado (Lamprea et al., 2000), mostrando que aferências colinérgicas lesionadas em estruturas prosencefálicas podem alterar o conteúdo colinérgico nessas áreas mas não prejudicar diretamente as respostas de ansiedade de ratos durante testes experimentais de ansiedade.

Testes relacionados ao condicionamento aversivo são considerados modelos ideais para o estudo de efeitos colinérgicos nos processos de aprendizado e memória por diversas razões: as lesões seletivas de estruturas límbicas (*e.g.* amígdala e hipocampo) mostraram-se capitais em testes de condicionamento Pavloviano e esquivas inibitórias, assemelhando-se aos déficits observados em humanos que apresentam lesões nessas mesmas estruturas; como o condicionamento aversivo é aprendido rapidamente, até mesmo com um único teste de condicionamento é possível investigar a dinâmica temporal dos mecanismos envolvidos, com um bom grau de resolução; as memórias aversivas geradas pelos procedimentos de condicionamento tendem a ser muito estáveis durante longos períodos, sendo observado um comportamento de congelamento robusto frente ao contexto ou som até 16 meses após o condicionamento (Gale et al., 2004). No teste do condicionamento aversivo contextual, o animal é posicionado em um

ambiente neutro (caixa de choque) e, após a exploração da caixa por alguns minutos, é aplicado um estímulo aversivo (choque) nas patas do rato, que desempenha então uma atividade locomotora vigorosa enquanto o estímulo persiste, diminuindo gradualmente e sendo substituído por uma imobilidade profunda caracterizada como um comportamento de congelamento (*freezing*), que é usado como índice de avaliação (Blanchard e Blanchard, 1969). Embora nossos resultados e estudos prévios (Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2013; Hoeller et al., 2011; Hoeller et al., 2013a; Hoeller et al., 2013b) tenham consistentemente demonstrado alterações nas respostas emocionais de ratos tratados com pilocarpina e avaliados em diferentes testes de ansiedade/medo incondicionada/o (*e.g.* labirinto em cruz elevado, labirinto em T elevado e campo aberto), a caracterização desses efeitos em um teste condicionado (*i.e.* condicionamento aversivo contextual) não evidenciou quaisquer alterações evidentes em ratos tratados com pilocarpina e avaliados 24 h ou um mês após o tratamento, utilizando diferentes intensidades de choque (dados com intensidade de 0,7 mA não mostrados). Assim, não foi possível correlacionar os efeitos de longo prazo previamente observados (em testes incondicionados) com as condições de ansiedade, medo e a formação de memórias observadas no teste de condicionamento.

Embora o presente estudo não tenha observado modificações comportamentais dos ratos tratados com pilocarpina e submetidos ao modelo de condicionamento aversivo, o hipocampo é relatado como necessário no medo condicionado ao contexto e som (Phillips e LeDoux, 1992; Quinn et al., 2002), além de estar implicado nos efeitos ansiogênicos desencadeados pela pilocarpina, conforme observamos em nossos estudos [*e.g.* inibição dos efeitos ansiogênicos quando a fímbria-fórnix é bloqueada (Duarte et al., 2010), aumento do ritmo teta hipocampal (Duarte et al., 2013), aumento na expressão das proteínas FOS e na diminuição da expressão dos receptores NMDA]. Além disso, investigações sobre a modulação do sistema colinérgico muscarínico em testes de condicionamento Pavloviano têm mostrado efeitos inconsistentes. A administração de antagonistas do receptor NMDA ou acetilcolina no hipocampo durante o treinamento em testes de condicionamento aversivo levou a déficits no aprendizado durante o medo condicionado ao contexto, mas não ao som (Gale et al., 2001; Young et al., 1994), sugerindo que o papel do hipocampo no condicionamento Pavloviano pode estar mais relacionado a certas classes de estímulos condicionados do que à formação da associação

entre estímulos condicionado e incondicionado (Fendt e Fanselow, 1999; Maren e Fanselow, 1995). Injeções de escopolamina previamente ao treino reduzem a aquisição de medo condicionado contextual em ratos em uma dose que não altera o medo condicionado ao som, num protocolo usando múltiplos ensaios (choques) de condicionamento. A manipulação imediata ou 24 h após o treino não promoveu alterações na duração do comportamento de congelamento, indicando o envolvimento colinérgico na aquisição, mas não na consolidação da memória aversiva (Anagnostaras et al., 1995). Em contraste, injeções de escopolamina antes ou até 3 h após o condicionamento Pavloviano alteraram tanto o condicionamento ao som como ao contexto, quando uma única sessão de choque foi realizada, indicando a participação do sistema muscarínico na consolidação da memória aversiva. No entanto, quando múltiplas sessões de choque foram realizadas, nenhum efeito após o treino foi observado sobre o medo condicionado ao som, indicando que um fator essencial para determinar como a administração sistêmica de drogas colinérgicas modifica o condicionamento Pavloviano pode estar relacionado ao número de sessões de choques realizados (Rudy, 1996).

É importante evidenciar que a ausência de alterações comportamentais (*e.g.* duração de congelamento) em testes de medo condicionado podem não refletir necessariamente as sensações interoceptivas do animal avaliado (*e.g.* sensações de dor, temperatura, coceira, tensão muscular, desconforto gástrico) que fornecem uma informação integrada da condição fisiológica do corpo (Craig, 2002; Paulus e Stein, 2010). A ínsula é considerada o centro interoceptivo do encéfalo, e é fundamental na avaliação sobre o impacto que diferentes estímulos promovem sobre o corpo (Paulus e Stein, 2006). Juntamente com o córtex pré-frontal, a ínsula tem um papel primordial na detecção de estímulos emocionais acentuados (Phillips et al., 1998), assim como na geração e regulação de respostas afetivas (Phillips et al., 2003). Nesse sentido, acreditamos que um estudo sistemático com diferentes protocolos experimentais (*e.g.* diferentes padrões de choque, tratamento em diferentes períodos do condicionamento) ou a adição de diferentes fatores de condicionamento (*e.g.* condicionamento olfatório aversivo, sobressalto potencializado pelo medo) possa melhor revelar o efeito da pilocarpina sobre as respostas de medo e ansiedade.

Embora o medo condicionado Pavloviano tenha sido relatado como um modelo ideal para o estudo da conexão aprendizado-potenciação de longo prazo (LTP, Maren, 2001) e as propriedades da LTP (*e.g.* rápida indução e associatividade) sejam apontadas como

candidatas ideais na codificação de memórias aversivas (Rogan e LeDoux, 1996), nossos estudos em relação aos efeitos da pilocarpina sobre a plasticidade sináptica de fatias de hipocampo não foram modificados durante a indução desse fenômeno sináptico, corroborando os achados comportamentais do teste de condicionamento aversivo contextual.

A LTP caracteriza-se por um aumento duradouro dos potenciais pós-sinápticos emitidos após a liberação de um estímulo indutor - tipicamente uma estimulação elétrica de alta frequência (Bliss e Lomo, 1973; Bliss e Collingridge, 1993). A ocorrência de LTP depende da ativação de canais dependentes de voltagem que comumente envolve a interação do neurotransmissor excitatório glutamato, especialmente com receptores NMDA (Bashir et al., 1990; Bashir et al., 1991). Existem inúmeras evidências de que a atividade colinérgica facilite a LTP em várias regiões encefálicas, incluindo o hipocampo (Auerbach e Segal, 1996; Hasselmo, 1999; Li et al., 2007). A ativação de receptores muscarínicos facilita a indução de LTP no hipocampo, sendo que em registros *in vitro* da região CA1, a infusão de baixas doses de carbacol previamente à tetanização da fatia aumenta significativamente a LTP sem alterar a transmissão basal (Auerbach e Segal, 1994; Blitzer et al., 1990; Shinoe et al., 2005). O mesmo ocorre em fatias do giro denteado (Burgard e Sarvey, 1990), sendo que em ambas as regiões esse efeito é criticamente dependente da ativação do subtipo M1 dos receptores muscarínicos (Boddeke et al., 1992; Burgard e Sarvey, 1990; Shinoe et al., 2005). No entanto, a importância do subtipo M1 na plasticidade sináptica tem sido questionada, pois camundongos *knockout* para receptores colinérgicos do subtipo M1 apresentaram apenas déficits leves na LTP da região CA1 e no aprendizado (Anagnostaras et al., 2003). Assim, embora a transmissão colinérgica para o hipocampo seja importante no controle da LTP, a interrupção da sinalização colinérgica endógena através da destruição das aferências colinérgicas não inibe consistentemente a indução de LTP, sugerindo uma função secundária desse sistema na plasticidade neuronal (Jouveneau et al., 1996).

A aplicação de agonistas muscarínicos em fatias de hipocampo também produzem oscilações na frequência teta que modulam a indução de LTP (Huerta e Lisman, 1995; MacVicar e Tse, 1989), sendo que o carbacol induz um aumento de atividade teta vinculada à supressão muscarínica da inibição GABAérgica e indução de LTP na região CA1 (Natsume e Kometani, 1997). Além disso, a ativação de receptores muscarínicos (inclusive do subtipo M1) pode facilitar a indução de LTP

pelo aumento da despolarização de membrana induzida pelo receptor NMDA (Aramakis et al., 1999; Marino et al., 1998). Levando em consideração a grande densidade de expressão do subtipo M1 na região hipocampal e a maior afinidade da pilocarpina a estes receptores, é possível que a administração de pilocarpina não promova um efeito contundente sobre a LTP, mas apenas tenha um papel facilitatório que não é suficiente para alterar a magnitude da sua expressão. Desta forma, embora a administração de uma dose ansiogênica de pilocarpina possa aumentar a incidência de ritmo teta (um facilitador da LTP), o efeito desencadeado pode ser modulado por alterações na expressão de receptores NMDA (também facilitadores da LTP) que se encontram diminuídos após o tratamento com pilocarpina (ver discussão adiante).

De acordo com Laborit (1988), a ansiedade torna-se evidente quando uma resposta adaptativa não é viável frente a um estímulo potencialmente aversivo, dependendo então da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Nossos resultados evidenciaram que o tratamento com uma dose ansiogênica de pilocarpina promoveu um grande aumento dos níveis de corticosterona plasmática 24 h após o tratamento, persistindo este efeito até 1 mês após a administração do agonista colinérgico. Este efeito foi associado ao aumento dos níveis plasmáticos do hormônio ACTH 24 h após o tratamento, que não persiste 1 mês após a administração de pilocarpina.

O estresse é capaz de alterar as capacidades emocionais e cognitivas em humanos e roedores, sendo inclusive relacionado aos transtornos de estresse pós-traumático, ansiedade, memória e depressão quando há persistência dos sintomas por um longo prazo (McEwen, 2000; Mezey e Robbins, 2001). A liberação de hormônios esteroides adrenais (glicocorticoides) é uma resposta normal ao estresse, embora quando ocorra de forma crônica esteja associada a diversas doenças e eventos neurotóxicos, como a liberação excessiva de glutamato no hipocampo (Sapolsky, 2003). O hipocampo é ricamente innervado por neurônios colinérgicos, como já citado, apresentando um papel importante nas funções comportamentais e cognitivas relacionadas ao estresse. Além disso, a acetilcolina é capaz de modular a atividade neuronal alterando características eletrofisiológicas de sinapses colinérgicas e não-colinérgicas (Hasselmo, 2006). As alterações anatômicas promovidas pelo estresse encontradas no hipocampo e amígdala (Vyas et al., 2002) parecem consistentes com as suas diferentes funções na circuitaria, tendo o hipocampo uma importante

função inibitória sobre o eixo HPA, enquanto a amígdala efetua ações excitatórias (Herman e Cullinan, 1997).

Estudos recentes em roedores têm mostrado os efeitos de longo prazo causados por uma única exposição a um estímulo estressor (*e.g.* choque, contenção), resultando na dessensibilização de receptores de glicocorticoides e alterações dos níveis plasmáticos de corticosterona e, em menor escala, de ACTH, sugerindo a existência de influências específicas do estímulo estressor na regulação da secreção adrenocortical, independente de ACTH (Armario, 2006). De forma similar, nossos dados sugerem que os efeitos desencadeados pela pilocarpina podem ser mediados por vias centrais num período agudo (até 24 h após o tratamento). Não está ainda claro por que os animais tratados com pilocarpina exibem altos níveis de corticosterona um mês após o tratamento sem a associação com alterações dos níveis circulantes de ACTH. É possível especular que os altos índices de corticosterona observados um mês após o tratamento possam ser resultantes de alterações epigenéticas ativadas pelo estímulo colinérgico (*e.g.* alterações na expressão de receptores de glicocorticoides). No entanto, levando em consideração que a função adrenocortical é apenas parcialmente dependente ao longo do ritmo circadiano das concentrações de ACTH (Dallman et al., 1976), existe a possibilidade de que o aumento de corticosterona observado um mês após a administração sistêmica de pilocarpina seja o reflexo da ação de uma via direta do hipotálamo para as glândulas adrenais através do nervo esplênico, que age estimulando a sua secreção independentemente dos níveis plasmáticos de ACTH (Jasper e Engeland, 1994).

Embora Campeau e Watson (1997) tenham relatado uma correlação direta entre o aumento dos níveis de corticosterona – um marcador da ativação do eixo HPA – com o aumento de células imunorreativas à FOS - cuja transcrição gênica é ativada pela atividade neuronal, nossos dados mostram que a expressão da proteína FOS no hipocampo de ratos tratados com a dose ansiogênica de pilocarpina (150 mg/kg) encontra-se aumentada apenas um mês após o tratamento. Ratos que desenvolveram crises convulsivas após administração de uma dose elevada de pilocarpina (400 mg/kg) apresentam grande quantidade de neurônios imunorreativos à FOS no hipocampo, córtex frontal e cingulado, estriado, *accumbens*, assim como em algumas áreas talâmicas (Barone et al., 1993), enquanto uma dose baixa de pilocarpina (25 mg/kg) é capaz de aumentar os níveis de RNAm por c-FOS e a expressão da proteína no hipocampo e regiões corticais de ratos jovens e

idosos (Bucci et al., 1998). Em contrapartida, a ativação de FOS é consideravelmente reduzida frente a estímulos repetidos de estresse por contenção em áreas límbicas como o PVN e a porção medial da amígdala (Chen e Herbert, 1995), córtex, hipocampo e área septal (Melia et al., 1994), havendo habituação da expressão da proteína, o que é consistente com a dessensibilização das respostas de ACTH a estímulos repetidos (Kovács, 1998), conforme evidenciado em animais tratados com pilocarpina em nosso estudo (aumento de ACTH 24 h, mas não um mês após o tratamento).

O hipocampo possui uma alta concentração de mineralocorticoides e glicocorticoides, sendo por isso a região do encéfalo mais suscetível às alterações dos níveis de glicocorticoides, exercendo uma importante função inibitória na atividade do eixo HPA e na finalização das respostas ao estresse (Jacobson e Sapolsky, 1991). O glicocorticoide corticosterona em roedores é o maior mediador das respostas fisiológicas ao estresse e atua sobre vários sistemas para permitir uma reação biológica frente ao estressor. Durante um período agudo, o aumento dos níveis de corticosteroides resulta em respostas adaptativas, mas a elevação durante um longo período pode gerar um efeito negativo no sistema nervoso central, e tem sido associado a prejuízos cognitivos (O'Brien, 1997) e possível neurotoxicidade (Sapolsky, 2000), além de lesionar o hipocampo, reduzindo consequentemente a efetividade do *feedback* negativo observado no eixo HPA (Sapolsky et al., 1985). Os glicocorticoides também promovem alterações na plasticidade hipocampal a partir da modulação de receptores NMDA (Magariños e McEwen, 1995), sugerindo que a maior expressão da proteína FOS na região do hipocampo pode resultar na ação inibitória sobre a secreção de ACTH um mês após a administração de pilocarpina, podendo este efeito ser ainda mediado por alterações da função hipocampal (*e.g.* modificação da expressão de receptores NMDA). Estudos sistemáticos acerca das estruturas envolvidas na modulação do eixo HPA ainda são necessários com intuito de melhor entender os efeitos causados pela dose ansiogênica de pilocarpina. O mapeamento funcional de células imunorreativas à FOS e expressão dos receptores NMDA e/ou glicocorticoides seriam então capazes de identificar os grupos neuronais envolvidos e seus possíveis mecanismos de ação associados aos efeitos previamente observados.

Conforme mencionado, a ativação de receptores muscarínicos (especialmente o subtipo M1) é capaz de potencializar a transmissão excitatória no sistema nervoso central através da ativação de receptores

NMDA (Volpicelli e Levey, 2004). O sistema glutamatérgico é conhecido por atuar efetivamente na modulação dos transtornos de ansiedade e no medo. O bloqueio da atividade excitatória gerada por receptores ionotrópicos pode promover um efeito ansiolítico, sendo que a administração de diferentes antagonistas do receptor NMDA promove respostas ansiolíticas em animais testados em diferentes testes de ansiedade incondicionada (Barkus et al., 2010). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com memantina – um antagonista do receptor NMDA que se liga ao sítio de Mg^{2+} no canal iônico (Chen et al., 1992) – em ratos tratados com pilocarpina e avaliados 24 h ou um mês após o tratamento foi capaz de bloquear os efeitos ansiogênicos previamente observados, sugerindo um mecanismo de ação que justifique as respostas ansiogênicas promovidas pela pilocarpina.

Os efeitos ansiolíticos observados a partir da ação de antagonistas do receptor NMDA parecem refletir o bloqueio desses receptores no hipocampo, levando em consideração que camundongos que não expressam a subunidade NR1 do receptor NMDA nas células granulares do giro denteado exibem LTP normal na região CA1 do hipocampo, embora apresentem um perfil ansiolítico em testes de ansiedade (Niewoehner et al., 2007). E camundongos que não expressam a subunidade NR2B do receptor NMDA nas células piramidais e granulares do hipocampo também apresentam um perfil ansiolítico similar (von Engelhardt et al., 2008).

A superexpressão ou hipoexpressão de receptores NMDA está envolvida em diversas patologias neurológicas como a esquizofrenia (Mohn et al., 1999), os transtornos de humor (Beneyto et al., 2007) e a ansiedade (Barkus et al., 2010). Inúmeras vias de transdução convergem em direção aos receptores NMDA modulando o seu ganho e, consequentemente, a eficácia da transmissão sináptica (Kotecha e MacDonald, 2003). Nossos resultados mostraram que a expressão das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA do hipocampo de ratos estavam diminuídas 24 h ou um mês após o tratamento com pilocarpina, sugerindo que a ativação de receptores muscarínicos (em especial o subtipo M1) pode modificar os níveis de ansiedade dos ratos tratados através de alterações plásticas (receptores NMDA) e, consequentemente, na excitabilidade celular hipocampal.

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos na diminuição da função do receptor NMDA. A ativação de cascatas de sinalização que convergem na ação da tirosina quinase (pertencente à família das quinases Src) leva a fosforilação das subunidades NR2A ou

NR2B ou proteínas acopladas ao receptor NMDA, promovendo a superexpressão desses receptores. Em contrapartida, a estimulação de receptores muscarínicos que estão acoplados à proteína Gq ativa a proteína tirosina fosfatase que, por sua vez, defosforila o receptor NMDA, levando à atenuação das suas respostas (Salter e Kalia, 2004). De acordo com Grishin e colegas (2004), esse conflito foi resolvido ao se mostrar que os receptores muscarínicos podem acoplar-se a duas vias divergentes que, respectivamente, potencializam ou deprimem as respostas do NMDA, sendo que a via que será favorecida dependerá dos níveis intracelulares de cálcio.

A hipossensibilização de receptores NMDA observada no hipocampo de ratos tratados com uma dose ansiogênica de pilocarpina evidencia a importante função das subunidades excitatórias desse receptor, além de revelar uma nova via de sinalização responsável pela modulação dos estados de ansiedade. Embora estudos sistemáticos dos eventos intracelulares relacionados à modulação de receptores muscarínicos sobre os NMDA, assim como a provável participação de Ca^{2+} intracelular nesses efeitos precisem ser melhor investigados, nossos achados sugerem um importante papel da ativação de receptores muscarínicos sobre a dessensibilização desses receptores que, possivelmente, interferem na regulação do eixo HPA e, conseqüentemente, podem explicar os efeitos ansiogênicos observados em ratos tratados com pilocarpina (ver figura 30 para um resumo das hipóteses aqui apresentadas).

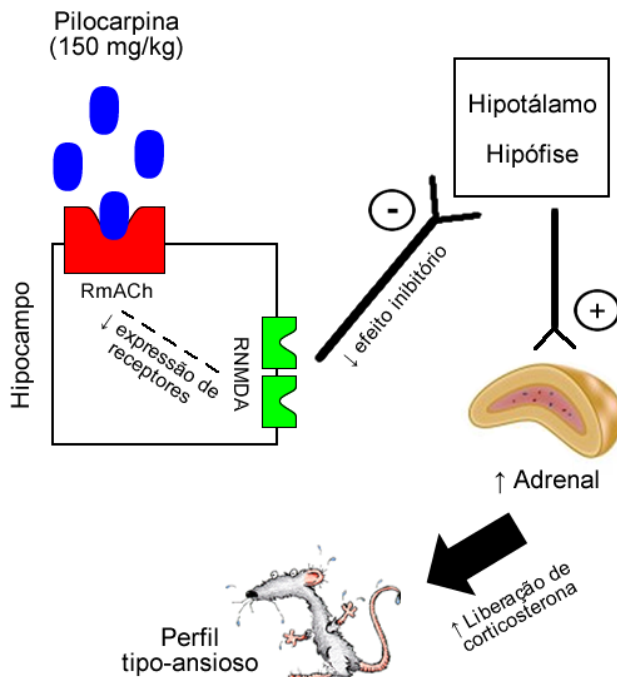


Figura 30 – Esquema do mecanismo de ação sugerido para a indução dos efeitos ansiogênicos de longo prazo promovidos pela pilocarpina. A ativação de receptores muscarínicos (especialmente do subtipo M1, densamente expressos no hipocampo) levaria à dessensibilização dos receptores NMDA no hipocampo, que resultaria em diminuição da ação inibitória dessa estrutura sobre o eixo HPA. O aumento da liberação de corticosterona e ACTH pode ser o responsável, ou coadjuvante, no estabelecimento do comportamento do tipo ansioso observado nos ratos tratados com pilocarpina.

6 CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que a estimulação central de receptores colinérgicos muscarínicos, através de uma única injeção sistêmica de pilocarpina (em doses subconvulsivas), é capaz de induzir comportamentos defensivos relacionados à ansiedade durante um longo período em ratos, efeitos estes não dependentes de atividades convulsivas. Os efeitos ansiogênicos parecem estar associados a um aumento da atividade teta hipocampal, que pode desempenhar um papel codificador na regulação do sistema septo-hipocampal sobre o eixo HPA, que está ativado, como indicado pela maior liberação de glicocorticoides. Além disso, observamos uma diminuição da expressão de receptores do tipo NMDA no hipocampo de ratos tratados com pilocarpina, sugerindo que alterações na atividade neuronal hipocampal inibitória sobre o eixo HPA podem ser responsáveis por mediar as respostas ansiogênicas observadas após o tratamento com pilocarpina.

Nossos achados são compatíveis com os preceitos da teoria de Gray e McNaughton (1983), que enfatiza o importante papel modulatório da circuitaria septo-hipocampal na regulação dos estados de medo e ansiedade através da ativação de aferências colinérgicas sobre estruturas límbicas. Levando em consideração as limitações no campo translacional de doenças psiquiátricas para modelos animais, os resultados aqui expostos podem auxiliar no refinamento de pesquisas pré-clínicas relacionadas aos transtornos de ansiedade, proporcionando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas respostas de ansiedade e estresse em roedores.

REFERÊNCIAS

- Acquas, E., Wilson, C., Fibiger, H.C., 1996. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci.* 16, 3089-96.
- Adamec, R.E., 1990. Amygdala kindling and anxiety in the rat. *Neuroreport.* 1, 255-8.
- Adamec, R.E., Morgan, H.D., 1994. The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol Behav.* 55, 1-12.
- Adhikari, A., Topiwala, M.A., Gordon, J.A., 2010. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron.* 65, 257-69.
- Adhikari, A., Topiwala, M.A., Gordon, J.A., 2011. Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron.* 71, 898-910.
- Adolphs, R., 2002. Neural systems for recognizing emotion. *Curr Opin Neurobiol.* 12, 169-77.
- Allredge, B., 2010. Pathogenic involvement of neuropeptides in anxiety and depression. *Neuropeptides.* 44, 215-24.
- Almeida-Filho, N., Mari, J.e.J., Coutinho, E., França, J.F., Fernandes, J., Andreoli, S.B., Busnello, E.D., 1997. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. *Br J Psychiatry.* 171, 524-9.
- Anagnostaras, S.G., Maren, S., Fanselow, M.S., 1995. Scopolamine selectively disrupts the acquisition of contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 64, 191-4.
- Anagnostaras, S.G., Murphy, G.G., Hamilton, S.E., Mitchell, S.L., Rahnama, N.P., Nathanson, N.M., Silva, A.J., 2003. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci.* 6, 51-8.
- Anderson, W.W., Collingridge, G.L., 2001. The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J Neurosci Methods.* 108, 71-83.
- Andrade, L., Walters, E.E., Gentil, V., Laurenti, R., 2002. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 37, 316-25.
- Andreatini, R., Blanchard, C., Blanchard, R., Brandão, M.L., Carobrez, A.P., Griebel, G., Guimarães, F.S., Handley, S.L., Jenck, F., Leite, J.R., Rodgers, J., Schenberg, L.C., Da Cunha, C., Graeff, F.G., 2001. The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis. *Braz J Med Biol Res.* 34, 145-54.
- Appleyard, M.E., Taylor, S.C., Little, H.J., 1990. Acetylcholinesterase activity in regions of mouse brain following acute and chronic treatment with a benzodiazepine inverse agonist. *Br J Pharmacol.* 101, 599-604.
- Aramakis, V.B., Bandrowski, A.E., Ashe, J.H., 1999. Role of muscarinic receptors, G-proteins, and intracellular messengers in muscarinic modulation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission. *Synapse.* 32, 262-75.

- Armario, A., 2006. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 5, 485-501.
- Auerbach, J.M., Segal, M., 1994. A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 72, 2034-40.
- Auerbach, J.M., Segal, M., 1996. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol*. 492 (Pt 2), 479-93.
- Babiloni, C., Vecchio, F., Mirabella, G., Buttiglione, M., Sebastiano, F., Picardi, A., Di Gennaro, G., Quarato, P.P., Grammaldo, L.G., Buffo, P., Esposito, V., Manfredi, M., Cantore, G., Eusebi, F., 2009. Hippocampal, amygdala, and neocortical synchronization of theta rhythms is related to an immediate recall during rey auditory verbal learning test. *Hum Brain Mapp*. 30, 2077-89.
- Babu, C.S., Satishchandra, P., Sinha, S., Subbakrishna, D.K., 2009. Co-morbidities in people living with epilepsy: hospital based case-control study from a resource-poor setting. *Epilepsy Res*. 86, 146-52.
- Baldwin, D.S., Anderson, I.M., Nutt, D.J., Bandelow, B., Bond, A., Davidson, J.R., den Boer, J.A., Fineberg, N.A., Knapp, M., Scott, J., Wittchen, H.U., Psychopharmacology, B.A.f., 2005. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 19, 567-96.
- Ballenger, J.C., 2000. Anxiety and Depression: Optimizing Treatments. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 2, 71-79.
- Barkus, C., McHugh, S.B., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N., Bannerman, D.M., 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol*. 626, 49-56.
- Barone, P., Morelli, M., Cicarelli, G., Cozzolino, A., DeJoanna, G., Campanella, G., DiChiara, G., 1993. Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. *Synapse*. 14, 1-9.
- Bashir, Z.I., Tam, B., Collingridge, G.L., 1990. Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for the induction of LTP. *Neurosci Lett*. 108, 261-6.
- Bashir, Z.I., Alford, S., Davies, S.N., Randall, A.D., Collingridge, G.L., 1991. Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature*. 349, 156-8.
- Belzung, C., Philippot, P., 2007. Anxiety from a phylogenetic perspective: is there a qualitative difference between human and animal anxiety? *Neural Plast*. 2007, 59676.
- Beneyto, M., Kristiansen, L.V., Oni-Orisan, A., McCullumsmith, R.E., Meador-Woodruff, J.H., 2007. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 32, 1888-902.
- Bergink, V., van Megen, H.J., Westenberg, H.G., 2004. Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol*. 14, 175-83.
- Beyenburg, S., Mitchell, A.J., Schmidt, D., Elger, C.E., Reuber, M., 2005. Anxiety in patients with epilepsy: systematic review and suggestions for clinical management. *Epilepsy Behav*. 7, 161-71.

- Bhatnagar, S., Costall, B., Smythe, J.W., 1997. Hippocampal cholinergic blockade enhances hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Brain Res.* 766, 244-8.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol.* 39, 43-68.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol.* 67, 370-5.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1990. An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In *Anxiety*. Vol., N. McNaughton, G. Andrews, ed. eds. University Press, Dunedin: Otago pp. 124-133.
- Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232, 331-56.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361, 31-9.
- Blitzer, R.D., Gil, O., Landau, E.M., 1990. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 119, 207-10.
- Boddeke, E.W., Enz, A., Shapiro, G., 1992. SDZ ENS 163, a selective muscarinic M1 receptor agonist, facilitates the induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol.* 222, 21-5.
- Bortolotto, Z.A., Anderson, W.W., Isaac, J.T., Collingridge, G.L., 2001. Synaptic plasticity in the hippocampal slice preparation. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 6, Unit 6.13.
- Bragatti, J.A., Torres, C.M., Londero, R.G., Martin, K.C., Souza, A.C., Hidalgo, M.P., Chaves, M.L., Bianchin, M.M., 2011. Prevalence of psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy in a Southern Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr.* 69, 159-65.
- Bucci, D.J., Rosen, D.L., Gallagher, M., 1998. Effects of age on pilocarpine-induced c-fos expression in rat hippocampus and cortex. *Neurobiol Aging.* 19, 227-32.
- Burgard, E.C., Sarvey, J.M., 1990. Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 116, 34-9.
- Buzsáki, G., Leung, L.W., Vanderwolf, C.H., 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* 287, 139-71.
- Campeau, S., Watson, S.J., 1997. Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *J Neuroendocrinol.* 9, 577-88.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 1193-205.
- Caulfield, M.P., Birdsall, N.J., 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50, 279-90.
- Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C., Turski, L., 1991. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural

- damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 32, 778-82.
- Cavalheiro, E.A., Fernandes, M.J., Turski, L., Naffah-Mazzacoratti, M.G., 1994. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia*. 35, 1-11.
- Cavalli, J., Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P., 2009. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 92, 512-8.
- Cavazos, J.E., Jones, S.M., Cross, D.J., 2004. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience*. 126, 677-88.
- Ceccarelli, I., Casamenti, F., Massafra, C., Pepeu, G., Scali, C., Aloisi, A.M., 1999. Effects of novelty and pain on behavior and hippocampal extracellular ACh levels in male and female rats. *Brain Res*. 815, 169-76.
- Charney, D.S., 2003. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 38-50.
- Chen, H.S., Pellegrini, J.W., Aggarwal, S.K., Lei, S.Z., Warach, S., Jensen, F.E., Lipton, S.A., 1992. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci*. 12, 4427-36.
- Chen, X., Herbert, J., 1995. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience*. 64, 675-85.
- Cilio, M.R., Sogawa, Y., Cha, B.H., Liu, X., Huang, L.T., Holmes, G.L., 2003. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. *Epilepsia*. 44, 518-28.
- Cobb, S.R., Davies, C.H., 2005. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol*. 562, 81-8.
- Collombet, J.M., 2011. Nerve agent intoxication: recent neuropathophysiological findings and subsequent impact on medical management prospects. *Toxicol Appl Pharmacol*. 255, 229-41.
- Cornwell, B.R., Arkin, N., Overstreet, C., Carver, F.W., Grillon, C., 2012. Distinct contributions of human hippocampal theta to spatial cognition and anxiety. *Hippocampus*.
- Cortese, B.M., Phan, K.L., 2005. The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr*. 10, 820-30.
- Covolan, L., Mello, L.E., 2000. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*. 39, 133-52.
- Craig, A.D., 2002. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci*. 3, 655-66.
- Cruz, A.P., Frei, F., Graeff, F.G., 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 49, 171-6.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S., Avoli, M., 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 172, 143-57.

- Dallman, H.F., Siedenburg, F., Shinsako, J., 1976. Parachlorophenyl (PCPA) treatment changes adrenal sensitivity to ACTH. In Vth international congress of endocrinology. Vol., E. Knobil, ed. ^eds., Giessen, Hambourg, pp. p. 193.
- Dasari, S., Gullledge, A.T., 2011. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 105, 779-92.
- Davies, S.G., Roberts, P.M., Stephenson, P.T., Thomson, J.E., 2009. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosinine. *Tetrahedron Letters.* 50, 3509-3512.
- Davis, M., Rainnie, D., Cassell, M., 1994. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.* 17, 208-14.
- Davis, M., 1998. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry.* 44, 1239-47.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joëls, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 19, 269-301.
- de Oliveira, D.L., Fischer, A., Jorge, R.S., da Silva, M.C., Leite, M., Gonçalves, C.A., Quillfeldt, J.A., Souza, D.O., e Souza, T.M., Wofchuk, S., 2008. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia.* 49, 842-52.
- De-Mello, N., Souza-Junior, I.Q., Carobrez, A.P., 2005. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res.* 158, 263-8.
- Degroot, A., Treit, D., 2003. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience.* 117, 493-501.
- Degroot, A., Nomikos, G.G., 2006. Genetic deletion of muscarinic M4 receptors is anxiolytic in the shock-probe burying model. *Eur J Pharmacol.* 531, 183-6.
- Devinsky, O., 2003. Psychiatric comorbidity in patients with epilepsy: implications for diagnosis and treatment. *Epilepsy Behav.* 4 Suppl 4, S2-10.
- Dori, A., Oriol, S., Livneh, U., Duek, O., Lin, T., Kofman, O., 2011. Acetylcholinesterase inhibitor pretreatment alters stress-induced expression of acetylcholinesterase transcripts in the mouse brain. *Neuroscience.* 183, 90-8.
- Drever, B.D., Riedel, G., Platt, B., 2011. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res.* 221, 505-14.
- Duarte, F.S., Marder, M., Hoeller, A.A., Duzzioni, M., Mendes, B.G., Pizzolatti, M.G., De Lima, T.C., 2008. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology (Berl).* 197, 351-60.
- Duarte, F.S., Gavioli, E.C., Duzzioni, M., Hoeller, A.A., Canteras, N.S., De Lima, T.C., 2010. 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 (Berl).* 212, 653-61.
- Duarte, F.S., Duzzioni, M., Hoeller, A.A., Silva, N.M., Ern, A.L., Piermartiri, T.C., Tasca, C.I., Gavioli, E.C., Lemos, T., Carobrez, A.P., De Lima, T.C.,

2013. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? *Psychopharmacology (Berl)*. 227, 209-219.
- Dunn, J.D., Orr, S.E., 1984. Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp Brain Res*. 54, 1-6.
- Dutra, R.C., de Souza, P.R., Bento, A.F., Marcon, R., Bicca, M.A., Pianowski, L.F., Calixto, J.B., 2012. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: evidence for the underlying mechanisms. *Biochem Pharmacol*. 83, 531-42.
- Duzzioni, M., Calixto, A.V., Duarte, F.S., De Lima, T.C., 2008. Modulation of anxiety in rats evaluated in the elevated T-maze: evidence of the relationship between substance P and diazepam. *Behav Brain Res*. 187, 140-5.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 7, 88-95.
- Epstein, S., 1972. The nature of anxiety with emphasis upon its relationship to expectancy. In *Anxiety: Current trends in theory and research*. Vol. 2, C.D. Spielberger, ed.^eds. Academic Press, New York pp. 291–337.
- Erdoğan, F., Gölgeli, A., Küçük, A., Arman, F., Karaman, Y., Ersoy, A., 2005. Effects of pentylenetetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory and learning in immature rats. *Epilepsy Behav*. 6, 537-42.
- Fanselow, M.S., 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci*. 15, 177-82.
- Farach, F.J., Pruitt, L.D., Jun, J.J., Jerud, A.B., Zoellner, L.A., Roy-Byrne, P.P., 2012. Pharmacological treatment of anxiety disorders: current treatments and future directions. *J Anxiety Disord*. 26, 833-43.
- Faustino, T.T., Almeida, R.B., Andreatini, R., 2010. [Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies]. *Rev Bras Psiquiatr*. 32, 429-36.
- Feinstein, A., 1970. The pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease. *J Chron Dis*. 23, 455-468.
- Femenía, T., Gómez-Galán, M., Lindskog, M., Magara, S., 2012. Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders. *Brain Res*. 1476, 58-70.
- Fendt, M., Fanselow, M.S., 1999. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev*. 23, 743-60.
- File, S.E., Lister, R.G., 1984. Do the Reductions in Social-Interaction Produced by Picrotoxin and Pentylenetetrazole Indicate Anxiogenic Actions. *Neuropharmacology*. 23, 793-796.
- File, S.E., Gonzalez, L.E., Andrews, N., 1998. Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors. *Behav Neurosci*. 112, 352-9.
- Fisahn, A., Pike, F.G., Buhl, E.H., Paulsen, O., 1998. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature*. 394, 186-9.

- Flynn, D.D., Ferrari-DiLeo, G., Mash, D.C., Levey, A.I., 1995. Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 64, 1888-91.
- Frazier, C.J., Rollins, Y.D., Breese, C.R., Leonard, S., Freedman, R., Dunwiddie, T.V., 1998. Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci.* 18, 1187-95.
- Friedman, A., Behrens, C.J., Heinemann, U., 2007. Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 48 Suppl 5, 126-30.
- Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., Fanselow, M.S., 2001. Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: effects of intrahippocampal scopolamine infusion. *Hippocampus.* 11, 371-6.
- Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., Godsil, B.P., Mitchell, S., Nozawa, T., Sage, J.R., Wiltgen, B., Fanselow, M.S., 2004. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J Neurosci.* 24, 3810-5.
- Garakani, A., Mathew, S.J., Charney, D.S., 2006. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med.* 73, 941-9.
- Graef, S., Schönknecht, P., Sabri, O., Hegerl, U., 2011. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl).* 215, 205-29.
- Gray, J., McNaughton, N., 2000. *The neuropsychology of anxiety.* Vol., Oxford University Press, Oxford.
- Gray, J.A., McNaughton, N., James, D.T., Kelly, P.H., 1975. Effect of minor tranquilisers on hippocampal theta rhythm mimicked by depletion of forebrain noradrenaline. *Nature.* 258, 424-5.
- Gray, J.A., 1982. *The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry in To the Functions of the Septo-hippocampal System.* Vol., Oxford University Press, Oxford.
- Gray, J.A., McNaughton, N., 1983. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 7, 119-88.
- Griebel, G., Perrault, G., Tan, S., Schoemaker, H., Sanger, D.J., 1999. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. *Neuropharmacology.* 38, 965-77.
- Grillon, C., Baas, J., 2003. A review of the modulation of the startle reflex by affective states and its application in psychiatry. *Clin Neurophysiol.* 114, 1557-79.
- Grishin, A.A., Gee, C.E., Gerber, U., Benquet, P., 2004. Differential calcium-dependent modulation of NMDA currents in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci.* 24, 350-5.
- Grishin, A.A., Benquet, P., Gerber, U., 2005. Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca²⁺-dependent activation of tyrosine phosphatase. *Neuropharmacology.* 49, 328-37.

- Gröticke, I., Hoffmann, K., Löscher, W., 2007. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol.* 207, 329-49.
- Hajós, M., Hoffmann, W.E., Orbán, G., Kiss, T., Erdi, P., 2004. Modulation of septo-hippocampal Theta activity by GABAA receptors: an experimental and computational approach. *Neuroscience.* 126, 599-610.
- Hall, C.S., 1936. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology.* 22, 345-352.
- Handley, S.L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 327, 1-5.
- Hasselmo, M.E., 1999. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci.* 3, 351-359.
- Hasselmo, M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 16, 710-5.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78-84.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24, 151-80.
- Hoeller, A.A., Duzzioni, M., Duarte, F.S., Costa, A.P.R., De Pieri, C.H., Dos Santos, A.A., Farina, M., De Lima, T.C., 2011. Pharmacological validation of the non-convulsive pilocarpine-model of anxiety in rats as evaluated on the elevated plus-maze and open-field tests. Vol., ed.^eds. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, pp. 160.
- Hoeller, A.A., Duzzioni, M., Duarte, F.S., Leme, L.R., Costa, A.P., da Silva Santos, E.C., de Pieri, C.H., Dos Santos, A.A., Aita Naime, A., Farina, M., de Lima, T.C., 2013a. GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. *Brain Res.*
- Hoeller, A.A., Spiga, F., Lightman, S.L., Collingridge, G.L., Bortolotto, Z.A., De Lima, T.C.M., 2013b. Overactivation of muscarinic cholinergic receptors leads to long-term anxiogenic responses associated with hippocampal theta rhythm activity and HPA axis alterations. Vol., ed.^eds. 22nd IBNS Annual Meeting, Malahide.
- Hoffman, D.L., Dukes, E.M., Wittchen, H.U., 2008. Human and economic burden of generalized anxiety disorder. *Depress Anxiety.* 25, 72-90.
- Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N.M., Steckler, T., Griebel, G., 2003. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 24, 580-8.
- Hort, J., Brožek, G., Mares, P., Langmeier, M., Komárek, V., 1999. Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 40, 1177-83.

- Huerta, P.T., Lisman, J.E., 1995. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron*. 15, 1053-63.
- Jackson, M.J., Turkington, D., 2005. Depression and anxiety in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76 Suppl 1, i45-47.
- Jacobson, L., Sapolsky, R., 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*. 12, 118-34.
- Jasper, M.S., Engeland, W.C., 1994. Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology*. 59, 97-109.
- Jinks, A.L., McGregor, I.S., 1997. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res*. 772, 181-90.
- Jones, N.C., Salzberg, M.R., Kumar, G., Couper, A., Morris, M.J., O'Brien, T.J., 2008. Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Exp Neurol*. 209, 254-60.
- Jope, R.S., Morrisett, R.A., Snead, O.C., 1986. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol*. 91, 471-80.
- Jouveneau, A., Billard, J.M., Lamour, Y., Dutar, P., 1996. Persistence of CA1 hippocampal LTP after selective cholinergic denervation. *Neuroreport*. 7, 948-52.
- Jung, M.E., Lal, H., Gatch, M.B., 2002. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 26, 429-39.
- Kalynchuk, L.E., Pinel, J.P., Treit, D., Kippin, T.E., 1997. Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol Psychiatry*. 41, 438-51.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., Soreq, H., 1998. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*. 393, 373-7.
- Klimesch, W., 1999. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev*. 29, 169-95.
- Klinkenberg, I., Sambeth, A., Blokland, A., 2011. Acetylcholine and attention. *Behav Brain Res*. 221, 430-42.
- Konopacki, J., Golebiewski, H., Eckersdorf, B., Błaszczyk, M., Grabowski, R., 1997. Theta-like activity in hippocampal formation slices: the effect of strong disinhibition of GABAA and GABAB receptors. *Brain Res*. 775, 91-8.
- Kotecha, S.A., MacDonald, J.F., 2003. Signaling molecules and receptor transduction cascades that regulate NMDA receptor-mediated synaptic transmission. *Int Rev Neurobiol*. 54, 51-106.
- Kovács, K.J., 1998. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*. 33, 287-97.

- Kubová, H., Mares, P., Suchomelová, L., Brozek, G., Druga, R., Pitkänen, A., 2004. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci.* 19, 3255-65.
- Laborit, H., 1988. [The inhibition of action. Interdisciplinary approach of its mechanisms and physiopathology]. *Ann Med Psychol (Paris).* 146, 503-22.
- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C.A., Feldon, J., 2000. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav Neurosci.* 114, 1119-30.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Silveira, R., Morato, S., Walsh, T.J., 2000. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav Brain Res.* 117, 97-105.
- Lang, P.J., Davis, M., Ohman, A., 2000. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *J Affect Disord.* 61, 137-59.
- LeDoux, J.E., 1994. Emotion, memory and the brain. *Sci Am.* 270, 50-7.
- Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A., 1990. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 14, 511-7.
- Lesting, J., Geiger, M., Narayanan, R.T., Pape, H.C., Seidenbecher, T., 2011. Impaired extinction of fear and maintained amygdala-hippocampal theta synchrony in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 52, 337-46.
- Leung, L.S., 1998. Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev.* 22, 275-90.
- Leung, L.S., Shen, B., 2007. GABAB receptor blockade enhances theta and gamma rhythms in the hippocampus of behaving rats. *Hippocampus.* 17, 281-91.
- Li, S., Cullen, W.K., Anwyl, R., Rowan, M.J., 2007. Muscarinic acetylcholine receptor-dependent induction of persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience.* 144, 754-61.
- Lightman, S.L., Conway-Campbell, B.L., 2010. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci.* 11, 710-8.
- Lister, R.G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 46, 321-40.
- Little, H.J., 1991. The benzodiazepines: anxiolytic and withdrawal effects. *Neuropeptides.* 19 Suppl, 11-4.
- Liu, Z., Nagao, T., Desjardins, G.C., Gloor, P., Avoli, M., 1994. Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. *Epilepsy Res.* 17, 237-47.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Stringer, J.L., 1991. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol.* 37, 1-82.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- López, J.F., Akil, H., Watson, S.J., 1999. Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry.* 46, 1461-71.

- Löscher, W., 2002. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 50, 105-23.
- MacLeod, C., Rutherford, E.M., 1992. Anxiety and the selective processing of emotional information: mediating roles of awareness, trait and state variables, and personal relevance of stimulus materials. *Behav Res Ther.* 30, 479-91.
- MacVicar, B.A., Tse, F.W., 1989. Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol.* 417, 197-212.
- Magariños, A.M., McEwen, B.S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* 69, 89-98.
- Makino, S., Schulkin, J., Smith, M.A., Pacák, K., Palkovits, M., Gold, P.W., 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology.* 136, 4517-25.
- Maren, S., Fanselow, M.S., 1995. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci.* 15, 7548-64.
- Maren, S., 2001. Multiple roles for synaptic plasticity in Pavlovian fear conditioning. In *Neuronal Mechanisms of Memory Formation*. Vol., C. Holscher, ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge pp. 77-99.
- Marino, M.J., Rouse, S.T., Levey, A.I., Potter, L.T., Conn, P.J., 1998. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 11465-70.
- Marsh, L., Rao, V., 2002. Psychiatric complications in patients with epilepsy: a review. *Epilepsy Res.* 49, 11-33.
- Mcdonald, A.J., 1996. Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J Comp Neurol.* 365, 367-79.
- McEwen, B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 886, 172-189.
- McNaughton, N., Sedgwick, E.M., 1978. Reticular stimulation and hippocampal theta rhythm in rats: effects of drugs. *Neuroscience.* 3, 629-32.
- McNaughton, N., Corr, P.J., 2004. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev.* 28, 285-305.
- McNaughton, N., 2011. Trait anxiety, trait fear and emotionality: The perspective from non-human studies. *Special Issue on Anxiety (dedicated to the memory of Professor Blazej Szymura).* 50, 898-906.
- Melia, K.R., Ryabinin, A.E., Schroeder, R., Bloom, F.E., Wilson, M.C., 1994. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J Neurosci.* 14, 5929-38.

- Mellanby, J., Gray, J.A., Quintero, S., Holt, L., McNaughton, N., 1981. Septal driving of hippocampal theta rhythm: a role for gamma-aminobutyrate in the effects of minor tranquillizers? *Neuroscience*. 6, 1412-21.
- Mello, L.E., Cavalheiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T.L., Finch, D.M., 1993. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 34, 985-95.
- Meshorer, E., Erb, C., Gazit, R., Pavlovsky, L., Kaufer, D., Friedman, A., Glick, D., Ben-Arie, N., Soreq, H., 2002. Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science*. 295, 508-12.
- Mesulam, M.M., 1995. Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and thalamus of the human brain. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress Vol.*, F.E. Bloom, D.J. Kupfer, eds. Raven Press, New York.
- Meurs, A., Clinckers, R., Ebinger, G., Michotte, Y., Smolders, I., 2008. Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *Epilepsy Res.* 78, 50-9.
- Mezey, G., Robbins, I., 2001. Usefulness and validity of post-traumatic stress disorder as a psychiatric category. *BMJ*. 323, 561-3.
- Micheau, J., Marighetto, A., 2011. Acetylcholine and memory: a long, complex and chaotic but still living relationship. *Behav Brain Res.* 221, 424-9.
- Mohler, H., 2006. GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res.* 26, 731-40.
- Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Koller, B.H., 1999. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*. 98, 427-36.
- MONTGOMERY, K.C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 48, 254-60.
- Myhrer, T., 2007. Neuronal structures involved in the induction and propagation of seizures caused by nerve agents: implications for medical treatment. *Toxicology*. 239, 1-14.
- Möhler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*. 62, 42-53.
- Müller, C.J., Bankstahl, M., Gröticke, I., Löscher, W., 2009a. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *Eur J Pharmacol.* 619, 15-24.
- Müller, C.J., Gröticke, I., Bankstahl, M., Löscher, W., 2009b. Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Exp Neurol.* 219, 284-97.
- Nagao, T., Alonso, A., Avoli, M., 1996. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience*. 72, 399-408.

- Natsume, K., Kometani, K., 1997. Theta-activity-dependent and -independent muscarinic facilitation of long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Res.* 27, 335-41.
- Niewoehner, B., Single, F.N., Hvalby, Ø., Jensen, V., Meyer zum Alten Borgloh, S., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N., Sprengel, R., Bannerman, D.M., 2007. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 25, 837-46.
- Nutt, D.J., Glue, P., Lawson, C., Wilson, S., 1990. Flumazenil provocation of panic attacks. Evidence for altered benzodiazepine receptor sensitivity in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 47, 917-25.
- Nutt, D.J., 2005. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectr.* 10, 49-56.
- Ormandy, G.C., Jope, R.S., Snead, O.C., 1989. Anticonvulsant actions of MK-801 on the lithium-pilocarpine model of status epilepticus in rats. *Exp Neurol.* 106, 172-80.
- O'Brien, J.T., 1997. The 'glucocorticoid cascade' hypothesis in man. Prolonged stress may cause permanent brain damage. *British Journal of Psychiatry.* 170, 199-201.
- Pamplona, F.A., Takahashi, R.N., 2006. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett.* 397, 88-92.
- Paulus, M.P., Stein, M.B., 2006. An insular view of anxiety. *Biol Psychiatry.* 60, 383-7.
- Paulus, M.P., Stein, M.B., 2010. Interoception in anxiety and depression. *Brain Struct Funct.* 214, 451-63.
- Pavlov, I.P., 1927. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex.* Vol., Oxford University Press, London.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Vol., Academic Press, San Diego.
- Pellow, S., 1985. Can drug effects on anxiety and convulsions be separated? *Neurosci Biobehav Rev.* 9, 55-73.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14, 149-67.
- Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 24, 525-9.
- Pellow, S., File, S.E., 1987. Can anti-panic drugs antagonise the anxiety produced in the rat by drugs acting at the GABA-benzodiazepine receptor complex? *Neuropsychobiology.* 17, 60-5.
- Phillips, L.J., McGorry, P.D., Garner, B., Thompson, K.N., Pantelis, C., Wood, S.J., Berger, G., 2006. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry.* 40, 725-41.
- Phillips, M.L., Young, A.W., Scott, S.K., Calder, A.J., Andrew, C., Giampietro, V., Williams, S.C., Bullmore, E.T., Brammer, M., Gray, J.A., 1998. Neural

- responses to facial and vocal expressions of fear and disgust. *Proc Biol Sci.* 265, 1809-17.
- Phillips, M.L., Drevets, W.C., Rauch, S.L., Lane, R., 2003. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry.* 54, 504-14.
- Phillips, R.G., LeDoux, J.E., 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 106, 274-85.
- Platt, B., Riedel, G., 2011. The cholinergic system, EEG and sleep. *Behav Brain Res.* 221, 499-504.
- Pollack, M.H., Otto, M.W., Roy-Byrne, P.P., Coplan, J.D., Rothbaum, B.O., Simon, N.M., Gorman, J.M., 2008. Novel treatment approaches for refractory anxiety disorders. *Depress Anxiety.* 25, 467-76.
- Porter, R.J., Rogawski, M.A., 1992. New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery. *Epilepsia.* 33 Suppl 1, S1-6.
- Power, J.M., Sah, P., 2008. Competition between calcium-activated K⁺ channels determines cholinergic action on firing properties of basolateral amygdala projection neurons. *J Neurosci.* 28, 3209-20.
- Pratt, J.A., 1992. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther.* 55, 149-81.
- Quinn, J.J., Oommen, S.S., Morrison, G.E., Fanselow, M.S., 2002. Post-training excitotoxic lesions of the dorsal hippocampus attenuate forward trace, backward trace, and delay fear conditioning in a temporally specific manner. *Hippocampus.* 12, 495-504.
- Quintero, S., Mellanby, J., Thompson, M.R., Nordeen, H., Nutt, D., McNaughton, N., Gray, J.A., 1985. Septal driving of hippocampal theta rhythm: role of gamma-aminobutyrate-benzodiazepine receptor complex in mediating effects of anxiolytics. *Neuroscience.* 16, 875-84.
- Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32, 281-94.
- Ramos, A., Berton, O., Mormède, P., Chaouloff, F., 1997. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res.* 85, 57-69.
- Reul, J.M., de Kloet, E.R., 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117, 2505-11.
- Rhudy, J.L., Meagher, M.W., 2000. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. *Pain.* 84, 65-75.
- Richter, M., Schilling, T., Muller, W., 1999. Muscarinic control of intracortical connections to layer II in rat entorhinal cortex slice. *Neurosci Lett.* 273, 200-2.
- Rodgers, R.J., Cole, J.C., 1994. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In *Ethology and Psychopharmacology.* Vol., S.J. Cooper, C.A. Hendrie, ed. eds. Wiley, Chichester, pp. 9-44.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 52, 297-303.

- Rodgers, R.J., Dalvi, A., 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 801-10.
- Rogan, M.T., LeDoux, J.E., 1996. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell.* 85, 469-75.
- Romcy-Pereira, R.N., de Araujo, D.B., Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N., 2008. A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and coherence analysis. *J Neurosci Methods.* 167, 384-92.
- Rossetti, F., Rodrigues, M.C., de Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N., 2006. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 72, 192-208.
- Rossetti, F., Rodrigues, M.C., Marroni, S.S., Fernandes, A., Foresti, M.L., Romcy-Pereira, R.N., de Araújo, D.B., Garcia-Cairasco, N., 2012. Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigro-tectal pathway in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain II: an EEG wavelet analysis and retrograde neuronal tracer approach. *Epilepsy Behav.* 24, 391-8.
- Roy-Byrne, P., Wingerson, D.K., Radant, A., Greenblatt, D.J., Cowley, D.S., 1996. Reduced benzodiazepine sensitivity in patients with panic disorder: comparison with patients with obsessive-compulsive disorder and normal subjects. *Am J Psychiatry.* 153, 1444-9.
- Rubin, R.T., Mandell, A.J., Crandall, P.H., 1966. Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulus sites. *Science.* 153, 767-8.
- Rudy, J.W., 1996. Scopolamine administered before and after training impairs both contextual and auditory-cue fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* 65, 73-81.
- Russel, R., 1964. Extrapolation from animals to man. In *Animal behavior and drug action*. Vol., H. Streinberg, ed. eds. Churchill, London, pp. 410-8.
- Salter, M.W., Kalia, L.V., 2004. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci.* 5, 317-28.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1985. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci.* 5, 1222-7.
- Sapolsky, R.M., Plotsky, P.M., 1990. Hypercortisolism and its possible neural bases. *Biol Psychiatry.* 27, 937-52.
- Sapolsky, R.M., 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 57, 925-35.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21, 55-89.
- Sapolsky, R.M., 2003. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res.* 28, 1735-42.
- Schetingier, M.R., Porto, N.M., Moretto, M.B., Morsch, V.M., da Rocha, J.B., Vieira, V., Moro, F., Neis, R.T., Bittencourt, S., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., 2000. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. *Neurochem Res.* 25, 949-55.

- Schulkin, J., Gold, P.W., McEwen, B.S., 1998. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology*. 23, 219-43.
- Seong, E., Seasholtz, A.F., Burmeister, M., 2002. Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet*. 18, 643-50.
- Shinoe, T., Matsui, M., Taketo, M.M., Manabe, T., 2005. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci*. 25, 11194-200.
- Sklan, E.H., Lowenthal, A., Korner, M., Ritov, Y., Landers, D.M., Rankinen, T., Bouchard, C., Leon, A.S., Rice, T., Rao, D.C., Wilmore, J.H., Skinner, J.S., Soreq, H., 2004. Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 5512-7.
- Smith, D.J., Taubman, M.A., Ebersole, J.L., King, W., 1982. Relationship between frequency of pilocarpine administration and salivary IgA level. *J Dent Res*. 61, 1451-3.
- Smolders, I., Khan, G.M., Manil, J., Ebinger, G., Michotte, Y., 1997. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol*. 121, 1171-9.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2, 294-302.
- Spielberger, C., Gorsuch, R., Lushene, R., 1970. *Manual for the State-Trait Anxiety Inventory*. Vol., Consulting Psychologists Press, Palo Alto, CA.
- Spiga, F., Liu, Y., Aguilera, G., Lightman, S.L., 2011. Temporal effect of adrenocorticotrophic hormone on adrenal glucocorticoid steroidogenesis: involvement of the transducer of regulated cyclic AMP-response element-binding protein activity. *J Neuroendocrinol*. 23, 136-42.
- Steimer, T., 2002. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci*. 4, 231-49.
- Swanson, L.W., Kohler, C., Bjorklund, A., 1987. The limbic region. I: The septohippocampal system. In *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol. Vol 5. Integrated systems of the CNS, Part I, A. Bjorklund, T. Hokfelt, L.W. Swanson, ed. ^eds. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 125-277.
- Swinkels, W.A., Kuyk, J., de Graaf, E.H., van Dyck, R., Spinhoven, P., 2001. Prevalence of Psychopathology in Dutch Epilepsy Inpatients: A Comparative Study. *Epilepsy Behav*. 2, 441-447.
- Sylvers, P., Lilienfeld, S.O., LaPrairie, J.L., 2011. Differences between trait fear and trait anxiety: implications for psychopathology. *Clin Psychol Rev*. 31, 122-37.
- Szyndler, J., Wierzbą-Bobrowicz, T., Skórzewska, A., Maciejak, P., Walkowiak, J., Lechowicz, W., Turzyńska, D., Bidziński, A., Płaźnik, A., 2005. Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. *Pharmacol Biochem Behav*. 81, 15-23.

- Tang, J., Gibson, S.J., 2005. A psychophysical evaluation of the relationship between trait anxiety, pain perception, and induced state anxiety. *J Pain*. 6, 612-9.
- Tang, R.R., Loke, W.K., 2011. Pilocarpine and nerve agents induced seizures: similarities and differences. In *Chemical-induced seizures: mechanisms, consequences and treatment*. Vol., R.R. Tang, W.K. Loke, ed.^eds. Bentham Science Publishers, pp. 89-106
- Tellegen, A., 1982. Brief manual for the Multidimensional Personality Questionnaire. Vol., ed.^eds., University of Minnesota.
- Tilelli, C.Q., Del Vecchio, F., Fernandes, A., Garcia-Cairasco, N., 2005. Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. *Epilepsy Behav*. 7, 401-10.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983a. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*. 9, 315-35.
- Turski, W.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L., 1983b. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*. 39, 1408-11.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Coimbra, C., da Penha Berzaghi, M., Ikonomidou-Turski, C., Turski, L., 1987. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. *Brain Res*. 434, 281-305.
- Tyrer, P., 1992. Anxiolytics not acting at the benzodiazepine receptor: beta blockers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 16, 17-26.
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 10, 397-409.
- van der Staay, F.J., Arndt, S.S., Nordquist, R.E., 2009. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct*. 5, 11.
- Vazquez, B., Devinsky, O., 2003. Epilepsy and anxiety. *Epilepsy Behav*. 4 Suppl 4, S20-5.
- Vertes, R.P., 2005. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus*. 15, 923-35.
- Volpicelli, L.A., Levey, A.I., 2004. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res*. 145, 59-66.
- von Engelhardt, J., Doganci, B., Jensen, V., Hvalby, Ø., Göngrich, C., Taylor, A., Barkus, C., Sanderson, D.J., Rawlins, J.N., Seeburg, P.H., Bannerman, D.M., Monyer, H., 2008. Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron*. 60, 846-60.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 22, 6810-8.
- Wall, P.M., Flinn, J., Messier, C., 2001. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 155, 58-68.
- Wess, J., 1996. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol*. 10, 69-99.

- Wess, J., Eglén, R.M., Gautam, D., 2007. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 721-33.
- Wieser, H.G., Epilepsy, I.C.o.N.o., 2004. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 45, 695-714.
- Wittchen, H.U., Jacobi, F., 2005. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. *Eur Neuropsychopharmacol.* 15, 357-76.
- Wittchen, H.U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jönsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Jennum, P., Lieb, R., Maercker, A., van Os, J., Preisig, M., Salvador-Carulla, L., Simon, R., Steinhausen, H.C., 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 21, 655-79.
- Wollensak, J., Kewitz, H., 1976. [One hundred years pilocarpine in ophthalmology (author's transl)]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 169, 660-3.
- Woods, S.W., Charney, D.S., Silver, J.M., Krystal, J.H., Heninger, G.R., 1991. Behavioral, biochemical, and cardiovascular responses to the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil in panic disorder. *Psychiatry Res.* 36, 115-27.
- Wolf, N.J., 1991. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol.* 37, 475-524.
- Young, S.L., Bohenek, D.L., Fanselow, M.S., 1994. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav Neurosci.* 108, 19-29.
- Zhu, W., Umegaki, H., Suzuki, Y., Miura, H., Iguchi, A., 2001. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in hippocampal cholinergic system-mediated activation of the hypothalamo--pituitary--adrenocortical axis in rats. *Brain Res.* 916, 101-6.
- Zimmerman, G., Soreq, H., 2006. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* 326, 655-69.
- Zwanzger, P., Bradwejn, J., Diemer, J., Marshall, R.W., Koszycki, D., 2012. Differences in saccadic eye movements in subjects at high and low risk for panic disorder. *Curr Pharm Des.* 18, 5685-90.
- Öhman, A., 1993. Fear and anxiety as emotional phenomena: Clinical phenomenology, evolutionary perspectives, and information-processing mechanisms. In *Handbook of emotions*. Vol., M. Lewis, J.M. Haviland, ed. ^eds. Guilford Press New York, pp. 511-536.

APÊNDICE A – Artigo publicado relacionado à tese

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

Anxiogenic-like profile of *Wistar* adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety?

Filipe S. Duarte · Marcelo Duzzioni · Alexandre A. Hoeller · Nayana M. Silva · Andy L. Ern · Tetsade C. Piermartiri · Carla I. Tasca · Elaine C. Gavioli · Tadeu Lemos · Antonio P. Carobrez · Thereza C. M. De Lima

Received: 9 July 2012 / Accepted: 9 December 2012 / Published online: 29 December 2012
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract

Rationale There is extensive evidence indicating the influence of seizures on emotional responses observed in human and animals, but so far few studies are focusing on the behavioral profile of animals that do not have seizures despite being treated with convulsant agents.

Objectives We aimed to establish the behavioral profile, biochemical, and electrographic features of rats submitted to the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

Methods Rats treated with pilocarpine (20 to 350 mg/kg, i.p.) that did not develop status epilepticus or spontaneous recurrent seizures were evaluated 1 month later in the elevated plus maze (EPM), T-maze (ETM), open-field (OF), and step-down avoidance tests. Electroencephalographic (EEG), glutamate uptake, and hippocampal neuronal death assays were also performed.

Results Pilocarpine (150 or 350 mg/kg) promoted anxiogenic-like effects in rats evaluated in the EPM, ETM, and OF tests, whereas only the highest dose evoked spike-wave discharges during EEG recordings. Hippocampal theta rhythm was increased by pilocarpine 150 or 350 mg/kg and only the highest dose reduced the $t\text{-}[^3\text{H}]\text{-glutamate}$ uptake and cell viability on hippocampal slices.

Conclusions Subconvulsant doses of pilocarpine promote long-lasting alterations on neural circuitry, reflected by an increased theta activity in the hippocampus and an anxiety-like profile of rats evaluated 1 month after the treatment which is independent of seizure occurrence and is not related to changes in glutamate uptake or hippocampal damage. These results prompt us to suggest that a systemic administration of subconvulsant doses of pilocarpine could be useful as a new tool to model trait anxiety in rats.

F. S. Duarte

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

M. Duzzioni · A. A. Hoeller · N. M. Silva · A. L. Ern · T. Lemos · A. P. Carobrez · T. C. M. De Lima (✉)
 Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina 88049-900, Brazil
 e-mail: thereza.lima@ufsc.br

T. C. Piermartiri · C. I. Tasca
 Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil

E. C. Gavioli
 Department of Biophysics and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte 59072-970, Brazil

Keywords Pilocarpine · Anxiety trait · Behavior · Glutamate · Cell death

Introduction

The pilocarpine model has been widely used to study the neural mechanisms and the cascade of molecular events involved in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy (Cavalheiro 1995; Leite et al. 1990; Turski et al. 1983a, b, 1984). When administered at high doses (>300 mg/kg), pilocarpine, a non-selective cholinergic agonist, promotes epileptic-like episodes and electroencephalographic (EEG) post-discharges which are crescent in duration, complexity, and spread, resulting in a generalized motor crisis (*status epilepticus*, SE) over the course of 24 h, a seizure-free period of about 15 days, followed by a chronic condition

characterized by spontaneous recurrent seizures (SRS) that may persist for months (Leite et al. 1990; Cavaleiro et al. 1991). Previous studies have revealed that pilocarpine induces a rise in glutamate levels in the hippocampus, followed by the occurrence of seizures which may be triggered and maintained by the activation of M1 and NMDA receptors, respectively (Nagao et al. 1996; Smolders et al. 1997).

There is also extensive evidence indicating the influence of seizures on emotional responses in human beings (Devinsky 2004; Jackson and Turkington 2005) and in animal models of epilepsy (Adamec et al. 2005; Cardoso et al. 2009; Dos Santos et al. 2005; Kalynchuk et al. 1997; Szyndler et al. 2005). Anxiety is the most common psychological disorder among people with epilepsy (Beyenburg et al. 2005), although the nature of the broader relationship between these two individual pathological conditions remains poorly understood (Haut et al. 2007). In rodents, the anxiogenic-like consequences of electrical kindling in limbic structures (Adamec 1990; Adamec and Morgan 1994; Helfer et al. 1996; Kalynchuk et al. 1997; Hannesson et al. 2005) and of pilocarpine-induced seizures were already documented (Detour et al. 2005; Gróttick et al. 2007).

A pilot study carried out by our research group revealed that rats which did not show SE after the injection of a high dose of pilocarpine—a phenomenon previously observed by Turcki et al. (1987), Mello et al. (1993), Cavaleiro et al. (1994)—showed an anxiogenic-like profile when evaluated in the elevated plus maze (EPM) test 1 month after. Such results brought up challenging issues since most investigators have focused their work on the generation and spread of seizures involved in these events and, so far, no attention has been paid to the behavioral changes observed in rats treated with convulsant doses of pilocarpine that did not present SE and/or SRS.

Recently, our research group showed that rats receiving subconvulsant doses of pilocarpine (150 mg/kg) presented a clear long-lasting anxiogenic-like profile when tested in the EPM, persisting for up to 3 months after the single systemic injection of pilocarpine (Duarte et al. 2010). Our preliminary data prompted us to evaluate the behavioral performance of rats treated with a high dose of pilocarpine (350 mg/kg) but which did not present SE or SRS 1 month after the treatment, in different experimental approaches to evaluate anxiety-like behavior [EPM, the elevated T-maze (ETM), and the open-field tests (OF)]. Subconvulsant doses of pilocarpine (20 and 150 mg/kg) are also evaluated in the present study in order to better characterize this phenomenon. The step-down avoidance task was used to evaluate putative changes induced by pilocarpine on aversive memory that could be underlying the anxiogenic-like profile. In addition, the consequences of the pilocarpine injection on glutamate uptake and cell viability on hippocampal slices of treated rats were also studied in attempt to correlate any

alterations with the behavioral changes. The hippocampus was selected as the area of interest because this seizure-prone region of the brain is recognized as being involved in the regulation of the brain excitability and has pivotal functions in affective and memory disturbances (Gray and McNaughton 1983).

Material and methods

Animals

Adult male Wistar rats were housed in groups of four animals per cage and kept in a room with controlled temperature (22 ± 2 °C) and a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 am), with food and water ad libitum, except during the experiments. Rats were allowed to adapt to the laboratory conditions for at least 1 week before the beginning of the behavioral experiments. Each animal was used just once. All experiments were conducted in accordance with the principles of ethics and animal welfare recommended by the Brazilian Law (# 11.794—8 October 2008) and the experimental protocols were approved by the Federal University of Santa Catarina Animal Care and Use Committee (# 23080.001156/2001-50/UFSC).

Electroencephalographic recordings

The electroencephalogram (EEG) was recorded using a polygraph digital system (BIOPAC System, MP-100/WSW, Inc). Signals were amplified 20,000 \times and filtered through a built-in 60-Hz notch filter, digitized at a sampling rate of 256 Hz and recorded using the acquisition software ACQKnowledge[®] version 3.2. EEG baseline recordings were assessed for 20 min before the injection of pilocarpine; EEG recordings were then re-started for up to 4 h daily over the course of 1 month besides continuous 24 h recordings which were carried out immediately after the treatment and 1 month later. Digital video recordings were made with a webcam (Orbit Logitech Quickcam[®]) located inside the Faraday cage and the animals' behavior was simultaneously recorded (for detailed information on surgery and procedures, see Duarte et al. 2008).

Drugs and treatment schedule

Pilocarpine hydrochloride (Merck SA, Brazil) and methylscopolamine bromide (RBI, USA) were dissolved in saline (NaCl 0.9 %) immediately before experiments and injected at a constant volume of 1 ml/1,000 g. Pilocarpine (20, 150, or 350 mg/kg) was intraperitoneally (i.p.) administered, preceded by methylscopolamine bromide (1 mg/kg), injected subcutaneously (s.c.) 30 min before in order to

prevent the peripheral cholinomimetic effects of pilocarpine (Leite et al. 1990; Cavalheiro et al. 1991). The control group was represented by animals treated with methylscopolamine (s.c.) and a saline injection (i.p.) 30 min later.

Behavioral assays

All behavioral experiments cited below were carried out between 1:00 and 5:00 pm and the sessions were recorded using a video camera (GeoVision Inc. GV-800 system, Taipei, Taiwan).

Elevated plus maze

The EPM was made of clear Plexiglas and consisted of two opposed open arms (50×10 cm) and two opposed enclosed arms (50×10×30 cm) mounted at an angle of 90°, all facing a central platform (10×10 cm), elevated 50 cm from the floor. To prevent falls, the open arms were surrounded by a 1-cm high acrylic rim. The apparatus was placed in a small room lit by a 15-W red light which provided 3 lx in both the open and enclosed arms. Each rat was used only once and was placed individually on the central platform facing an enclosed arm. The frequency of entries into either open or enclosed arms as well as the time spent in each arm type were cumulatively recorded (in seconds) for 5 min (Pellow et al. 1985). Ethological parameters such as unprotected head-dipping (uHD), open-arms end activity (OAEA, number of times the rat reached the end of an open arm), protected stretch-attend postures (pSAP), and rearing were also recorded to increase the sensitivity of the test (Cole and Rodgers 1994; Rodgers and Dalvi 1997).

Elevated T-maze

The ETM was made of wood and consists of three elevated arms of equal dimensions (50×10 cm), one of which featured 50-cm high walls and was oriented perpendicularly to the two opposed open arms. To avoid falls, the open arms were surrounded by a 1-cm high acrylic rim. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor and lighted by a 15-W red light. Each rat was placed at the distal end of the enclosed arm of the ETM and the time required to leave the arm with all four paws was recorded (BASELINE). After the enclosed arm exit, the animal was allowed to freely explore the maze for 10 s after which it was gently withdrawn from the maze and placed inside a polypropylene cage (30×20×15 cm) for 30 s. The animal was returned to the end of the enclosed arm for two successive trials and the time that elapsed before it left the arm was recorded again (AVOID 1 and AVOID 2). Thirty seconds after AVOID 2, the animal was placed at the distal end of the left open arm

and the time taken to fully enter into the enclosed arm was measured (escape, ESC; Zangrossi and Graeff 1997). The maze was cleaned with wet (ethanol 10 % v/v) and dry cloths between sessions. Any animal that fell off the maze was excluded from the experiment.

Open-field

The test was carried out in a large arena made from white Plexiglas with white walls 40-cm high. The floor of 100×100 cm was divided—by black lines—into 25 squares of 20×20 cm. The illumination in the test room was controlled using a red light bulb to provide about 3 lx inside the apparatus. Each rat was placed in the center of the OF and its behavior was recorded for 5 min. The variables observed were: time spent in the peripheral (adjacent to the walls) and central (away from the walls) areas plus the number of peripheral and central squares crossed (Ramos et al. 1997). The field was thoroughly cleaned with 10 % of ethanol solution between sessions.

Step-down avoidance task

The step-down avoidance task was performed in a Plexiglas box (30×20×20 cm) with a floor consisting of parallel stainless-steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brazil). A platform (20×8×1.5 cm) was located on the floor up against the right wall. Animals were placed on the platform and the latency to step down onto the grid with all four paws was measured with an automatic device. During the single training session, immediately after stepping down onto the grid, animals received a 0.3-mA, 2.0-s scrambled foot shock. During test sessions, no foot shock was applied and the step-down latency was used as a measure of retention (cutoff point, 180 s). The test sessions were evaluated at 5 s, 1.5 h, and 24 h after the training (Barros et al. 2005) and lighted by a 15-W red light.

Biochemical assay

*L*³-[³H]-Glutamate uptake

Rats were killed by decapitation and the entire hippocampus were rapidly removed and placed in ice-cold Krebs–Ringer bicarbonate buffer (KRB) with the following composition: 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 0.4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, and 10 mM D-glucose. The buffer was bubbled with 95 % O₂–5 % CO₂ up to pH 7.4. Slices (0.4 mm thick) were quickly prepared using a McIlwain Tissue Chopper, separated in KRB at 4 °C and allowed to recover for 30 min in KRB at 37 °C (Oliveira et al. 2002). Glutamate uptake was determined as previously

described (Molz et al. 2005). Briefly, after incubation, hippocampal slices were washed for 15 min at 35 °C in a Hank's balanced salt solution (HBSS), composition in millimolar: 1.29 CaCl₂, 136.9 NaCl, 5.36 KCl, 0.65 MgSO₄, 0.27 Na₂HPO₄, 1.1 KH₂PO₄, and 5 HEPES. Uptake was assessed by adding 0.33 μCi/ml of L-[³H]-glutamate, with 100 μM unlabeled glutamate. Incubation was stopped after 7 min by two ice-cold washes with 1 ml HBSS followed by the addition of 0.1 % NaOH/0.01 % SDS. Aliquots of slice lysates were taken for determination of the intracellular content of L-[³H]-glutamate by scintillation counting. Sodium-independent uptake was determined by using choline chloride instead of sodium chloride. This unspecific sodium-independent uptake was subtracted from the total uptake to obtain the specific sodium-dependent glutamate uptake. Results were obtained in nanomoles of L-[³H]-glutamate taken up per milligram of protein per minute. Specific L-[³H]-glutamate uptake in control hippocampal slices was 0.043±0.004 nmol/mg protein/min. The protein content was quantified by the method of Lowry (1951) and bovine serum albumin was used as standard.

Evaluation of cell viability

Cell viability was established via the ability of cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) (Mosmann 1983). Hippocampal slices were incubated with MTT (0.5 mg/ml) in KRBB for 30 min at 37 °C. The tetrazolium ring of MTT can be cleaved by active dehydrogenases in order to produce a formazan precipitate. The formazan produced was solubilized by adding 200 μl dimethyl sulfoxide, resulting in a colored compound measured by ELISA (550 nm).

Experimental procedures

In experiment 1, after 30 min of habituation, a 20-min baseline record was obtained prior to treatment. Rats then received methylscopolamine (1 mg/kg) 30 min before pilocarpine (20, 150, or 350 mg/kg) or a saline injection, followed by the behavioral and electrographic recordings, carried out for up to 1 month (4 h/day). SE was defined by the incidence of both EEG and behavioral seizure activities lasting at least 30 min.

In experiment 2, rats received the same treatment and were behaviorally evaluated in the EPM or ETM tests 1 month later. For the behavioral evaluation, animals which did not develop any behavioral features of SE (i.e., akinesia, facial automatisms, limbic seizures consisting of forelimb clonus with rearing, salivation, masticatory jaw movements, and falls) or SRS were included in the group with the highest dose (350 mg/kg).

In experiment 3, animals received methylscopolamine (1 mg/kg) 30 min prior to pilocarpine (150 or 350 mg/kg)

or saline injections and, 1 month later, were behaviorally evaluated in the OF or step-down avoidance tests. At the end of the experiments, the animals were killed in order to perform the biochemical evaluation (experiment 4—hippocampal glutamate transport and cell viability). See Fig. 1a for detailed information regarding the treatment schedule.

Statistical analysis

Data from EPM, ETM, step-down avoidance, and OF tests as well as biochemical parameters and EEG quantitative analysis were presented as mean±S.E.M. and evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Student–Newman–Keuls' test for multiple comparisons, with treatment as the only independent variable. A time-frequency spectral analysis using wavelet transform was performed on the EEG traces to evaluate the effects of pilocarpine (150 or 350 mg/kg) in rats recorded 1 month after the treatment. Frequencies between 3 and 40 Hz were analyzed in 10-s free-seizure epochs (30 samples selected during quiet behavior from 1-h recordings). In these epochs, the value of the most prominent frequencies was calculated (F1; the frequency with the highest power (in square microvolts per hertz) present at least 30 % in the selected epoch). Wavelet analysis was conducted in EEG signals exported from ACQKnowledge software to a Matlab (v. 6.5 R13 Mathworks, Inc, MA, USA) routine (Romey-Pereira et al., 2008; Rossetti et al., 2012). Data from step-down avoidance and T-maze tests were initially submitted to Levene's test for homogeneity of variance; where Levene's test yielded significance, the results were log-transformed and confirmed for homogeneity of variance before being subjected to one-way or repeated measures ANOVA followed by the post hoc Student–Newman–Keuls' test. Differences were considered to be significant when $p \leq 0.05$. All statistical analysis were performed using the software Statistica® 6.0 (StaSoft Inc, Tulsa, OK, USA) and the graphics were drawn with the GraphPad Prism version 4.0® software.

Results

Experiment 1: EEG activity and general behaviors

No behavioral changes or EEG abnormalities were observed in rats treated with the lowest dose of pilocarpine (20 mg/kg). Pilocarpine, at 150 mg/kg, rendered light salivation and piloerection immediately after the injection. These effects subsided within the following 30–45 min when the behavior was indistinguishable from that observed in the control group. The typical EEG pattern induced by pilocarpine at 20 or 150 mg/kg was comprised of desynchronized cortical (A₃)

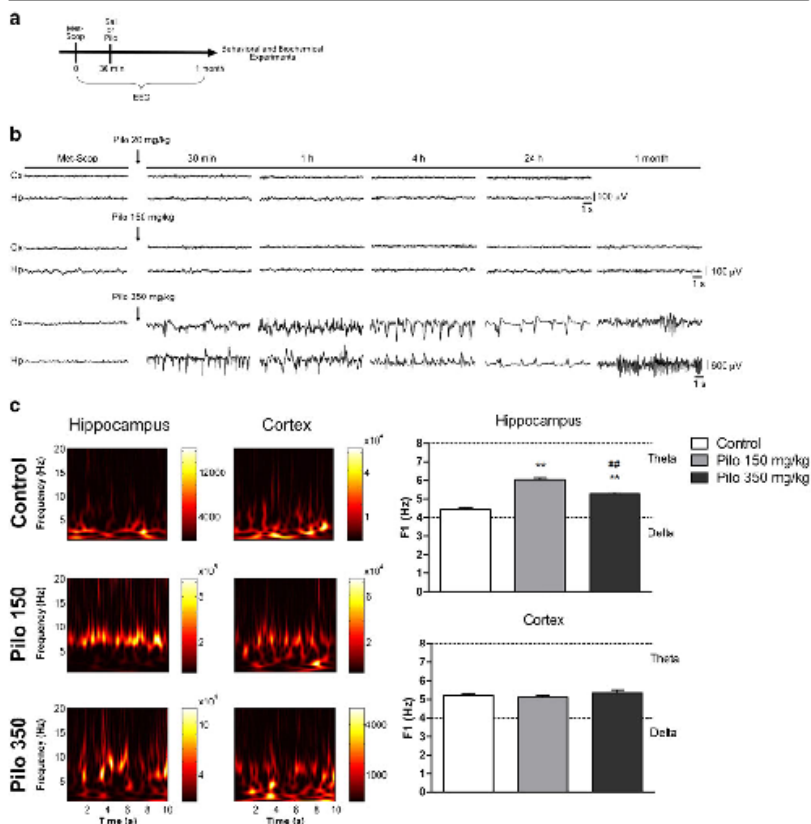


Fig. 1 a Outline of the treatments and experimental schedule: methylscopolamine (Msc-Scop, 1 mg/kg), saline (Sal, 0.9 %), pilocarpine (Pilo, 20, 150, or 350 mg/kg, ip.); b effects of Pilo 20, 150, or 350 mg/kg on EEG activity of rats ($n=7$). Representative EEG recordings (8–4 epochs) from cortical A₁ (Cx, upper) and hippocampal CA₁ (Hp, bottom) areas are shown; c representative EEG activity in the hippocampus and cortex with the respective wavelet analyses during a quiet free-seizure state. The first most prominent frequency (F1) during recordings in the cortex (top on the right) and hippocampus (bottom on the right) of rats treated with Pilo 150

or 350 mg/kg. After performing mathematical transformations, the component frequencies (in hertz) of the trace emerge, and their intensities (in square microvolts per hertz) are plotted in the frequency × intensity graphs. In the time × frequency graphs, the power of the spectrum is represented as calibration bars within each graph. Hot colors correspond to greater intensity values in each frequency. ** $P<0.0001$ as compared to control group and # $P<0.0001$ as compared to Pilo 150 mg/kg group (all comparisons were made by ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls' test)

activity and hippocampal (CA₁) theta rhythm for most of the experiment, with no differences when compared to baseline recordings (Fig. 1b).

Immediately after the injection of the highest dose of pilocarpine (350 mg/kg), rats showed akinesia, ataxic lurching, mouth automatism, face-washing, vibrissae-twitching,

and mild salivation. These symptoms persisted up to 1 h after the treatment before subsiding gradually over the next 2 h. EEG tracings comprised a hippocampal theta rhythm superimposed on the background activity 10 min later, followed by the appearance of isolated spike discharges in the hippocampus progressively spreading to the cortical area. This led to high-voltage fast activity with spiking in the hippocampus and cortex, becoming synchronized and evoking intermittent bursts of high-voltage fast polyspike activity 30–60 min later (Fig. 1b). Although these animals presented typical electrographic seizures, none of them developed SE or SRS.

One month after the treatment, only the animals given the highest dose of pilocarpine (350 mg/kg) showed brief discharges with intermediate-amplitude spikes on the EEG tracings (Fig. 1b). Furthermore, these animals exhibited spike-wave discharges of high amplitude (similar to those observed immediately after the injection of pilocarpine at the same dose) but epileptic-like behavior were not recognized during daily visual and EEG recordings accompanied by an unaltered behavior profile (normal exploratory, grooming, rearing, and locomotor activities) during daily recordings. In sharp contrast, animals treated with 150 mg/kg of pilocarpine did not present any EEG changes epileptic-like episodes in the EEG tracings (Fig. 1b). However, EEG quantitative analysis shows that both doses of pilocarpine (150 or 350 mg/kg) increased the incidence of theta range (F1 oscillation) in the hippocampus ($F(2,357)=35.22$; $P<0.0001$) when compared to the control group and

pilocarpine-treated groups whereas no differences were observed in the cortical area (Fig. 1c).

Experiment 2: EPM and ETM

As shown in Fig. 2, administration of pilocarpine at the doses of 150 or 350 mg/kg, but not at 20 mg/kg, significantly reduced the time spent (Fig. 2a; $F(3,53)=14.09$; $P<0.01$) and the entries into the open arms (Fig. 2b; $F(3,53)=16.04$; $P<0.01$) as well as the uHD (Fig. 2c; $F(3,53)=7.22$; $P<0.01$) and the OAEA in the EPM (Table 1; $F(3,53)=29.55$; $P<0.01$) whereas increasing the pSAP (Fig. 2d; $F(3,53)=19.39$; $P<0.01$) when compared to the control group. The entries into the enclosed arms and rearing behavior were not altered by any treatment (Table 1; $P>0.05$).

Figure 3a illustrates the effects elicited by the injection of pilocarpine on a rat's avoidance behavior of exploring the open arms of the ETM. The ANOVA showed significant differences for the repeated measures [$F(2,84)=43.60$, $P<0.000001$], treatment [$F(3,42)=14.31$, $P<0.000001$], and repeated measures \times treatment factors [$F(6,84)=3.16$, $P<0.01$] in the latency to the inhibitory avoidance behavior. Latency was significantly increased in AVOID 1 and 2 in relation to baseline measurements (Fig. 3a; $P<0.05$) in the control and pilocarpine (20, 150, or 350 mg/kg) groups. The post hoc test showed that the acquisition curve of inhibitory avoidance for the pilocarpine 150 mg/kg group was significantly steeper in trials AVOID 1 and 2 ($P<0.001$) and in the 350 mg/kg group in the baseline, AVOID 1 and 2 trials ($P<0.0001$) (Fig. 3a). However, FSC latency was

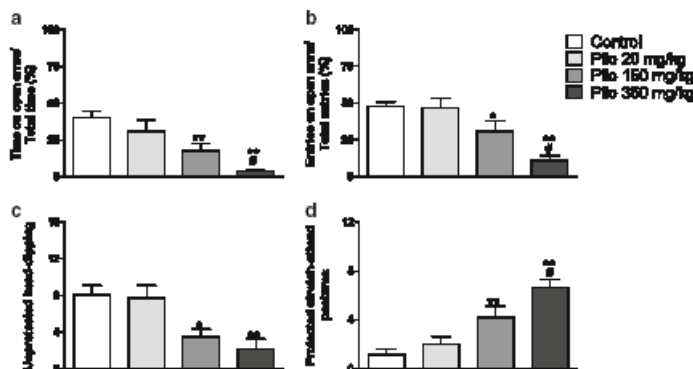


Fig. 2 Effects of pilocarpine (Pilo, 20, 150, or 350 mg/kg, ip.), 1 month after treatment, on the behavior of rats evaluated in the elevated plus-maze test, recorded for 5 min. Time spent in open arms (a), entries into the open arms (b), unprotected head-dipping (c), and protected stretch-attend postures (d). Each value represents the mean

S.E.M. of 11–17 animals. * $P<0.05$ or ** $P<0.01$ as compared to control and * $P<0.05$ as compared to Pilo 150 mg/kg group (all comparisons were made by ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls' test)

Table 1 Effects of pilocarpine (20, 150, or 350 mg/kg, i.p.) on several behavioral parameters observed of the elevated plus maze test in rats evaluated 1 month after the treatment

Treatments				Parameters	
i.p. (mg/kg)	Doses	N	EEA	OAEA	REA
Control	–	17	5.91±0.42	4.11±0.33	12.10±0.73
Pilo	20	12	4.57±0.43	3.75±0.43	13.14±2.04
Pilo	150	11	6.36±0.91	1.09±0.25*	11.64±1.45
Pilo	350	17	4.35±0.64	0.82±0.26*	11.15±1.60

Each value represents the mean±S.E.M. for 11–17 animals (N). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test

Pilo pilocarpine, EEA entries on enclosed arms, OAEA open-arms end activity, REA rearing

* $P < 0.01$ as compared to control group

not altered after the administration of different doses of pilocarpine (Fig. 3b; $P > 0.05$).

Experiment 3: open-field and step-down avoidance tests

Treatment with pilocarpine (150 or 350 mg/kg) reduced the time spent in the central area ($F(2,21)=5.85$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) and the number of central squares crossed ($F(2,21)=6.36$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively)

in the OF test (Table 2). These effects were not accompanied by changes in locomotion ($P > 0.05$, total number of crossed squares). Additionally, the ANOVA test did not reveal any significant effects of the pilocarpine treatment on the step-down latencies either during the training or test sessions ($P > 0.05$; Table 2).

Experiment 4: glutamate uptake and cell viability

Only the highest dose of pilocarpine (350 mg/kg) was able to reduce the glutamate uptake (Fig. 4a; $F(2,8)=7.55$, $P < 0.05$) and the cell viability (Fig. 4b; $F(2,8)=20.00$, $P < 0.001$) in hippocampal slices of rats processed 1 month after treatment.

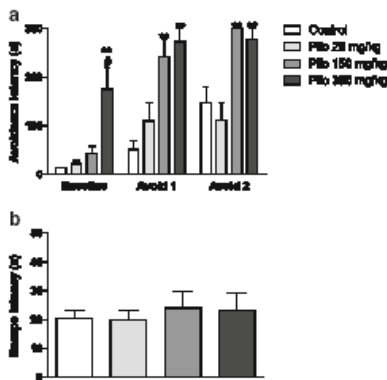


Fig. 3 Effects of pilocarpine (Pilo, 20, 150, or 350 mg/kg, i.p.), 1 month after the treatment, on the baseline and avoidance (AVOID 1 and 2) (a) trials in rats evaluated in the elevated T-maze. Escape latency (b) was measured 30 s after the inhibitory avoidance training. Bars represent the mean±S.E.M. of 10–16 animals. ** $P < 0.01$ as compared to control group (all comparisons were made by one-way or repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Student–Newman–Keuls' test)

Discussion

The present study aimed to investigate the electrographic and behavioral effects, as well as the $[\text{H}]$ -glutamate uptake and the cell viability in hippocampal slices, elicited 1 month after the treatment with increasing doses of pilocarpine (20, 150, and 350 mg/kg, i.p.) in rats. Only animals that did not develop SE and/or SRS during that period of time after the single systemic injection of pilocarpine were tested.

Intraperitoneal injection of pilocarpine in rats (>300 mg/kg) induces behavioral and electrographic alterations which resemble temporal lobe epilepsy in humans (Curia et al. 2008). Although the current study only evaluated rats which did not develop SE or SRS up to 1 month after the injection of pilocarpine, some behavioral changes were observed in the first hours after the treatment with the highest dose (350 mg/kg) such as ataxic hunching, mouth automatism, face-washing, vibrissae-twitching, and salivation. Additionally, EEG recordings showed high amplitude sharp wave discharges in both hippocampus and cortex throughout the recordings, but no epileptic-like pattern were observed 1 month after the treatment.

Table 2 Effects of pilocarpine (150 or 350 mg/kg, i.p.) on the behavioral parameters observed in the open-field and step-down avoidance tests in rats evaluated 1 month after the treatment

			Open-field			Step-down avoidance task			
Treatments	Doses	N	Parameters			Parameters			
i.p. (mg/kg)			TSC	CSC	TL	Basal	5 s	1.5 h	24 h
Control	–	8	23.88±2.55	13.25±1.52	71.38±7.82	11.18±6.00	51.08±20.21	97.51±28.29	53.64±9.83
Pilo	150	8	14.88±2.85*	8.75±0.45*	70.75±9.19	5.61±2.07	61.27±26.23	90.39±23.95	77.81±23.07
Pilo	350	8	13.25±1.48**	7.12±1.49**	69.13±11.85	11.55±8.36	92.51±26.34	128.21±25.74	98.23±25.82

Each value represents the mean±S.E.M. for eight animals (N). Data from the open-field and step-down avoidance tests were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls' test. In the step-down avoidance task, the behavioral variables represent the step-down latencies in basal and 5 s, 1.5 h, and 24 h after training

Pilo pilocarpine, TSC time spent in the central area, CSC central squares crossed, TL total locomotion

* $P<0.05$; ** $P<0.01$, compared to control group.

Anxiety test batteries are commonly used to investigate a working hypothesis, which are thought to reflect distinct facets of emotionality and also to provide a more reliable picture of an animal's emotional reactivity (Ramos 2008). Here, we used the EPM, ETM, and the OF tests in order to evaluate the anxiety-like behavior in pilocarpine-treated rats. In the EPM, our results showed an anxiogenic-like profile

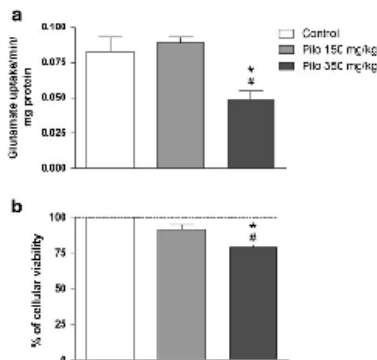


Fig. 4 Effects of pilocarpine (Pilo, 150 or 350 mg/kg, i.p.) 1 month after the treatment, on glutamate uptake (a) and cell viability (b) in hippocampal slices from rats. Glutamate uptake is expressed as nanomoles of $L\text{-}^3\text{H}$ glutamate taken up per milligram of protein per minute, and cell viability expressed as percentage of control in which the dashed line represents the mean of the values for control animals. Each value represents the mean±S.E.M. of eight animals per group. * $P<0.05$ or ** $P<0.01$ as compared to control values and $^{\#}P<0.05$ as compared to Pilo 150 mg/kg group (all comparisons were made by ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls' test)

induced by the highest dose of pilocarpine (350 mg/kg), as noted in four distinct behavioral measures: time spent on and entries into the open arms plus two ethological parameters of risk assessment (uHD and pSAP). Additionally, the long-lasting effects caused by this treatment seem to be specific since they did not alter the number of entries into the enclosed arms of the EPM, a parameter well-known to reflect the locomotor activity of rodents (Wall and Messier 2000). Similar results in the EPM test were found after the treatment with a non-convulsant dose of pilocarpine (150 but not 20 mg/kg), confirming previous results (Duarte et al. 2010).

The ETM apparatus, on the other hand, provides information on the different types of anxiety, permitting the measurement, in the same animal, of two kinds of aversively motivated behaviors (inhibitory avoidance and one-way escape) (Graeff et al. 1993; Zangrossi and Graeff 1997; De Mello and Carobrez 2002). Although EPM and ETM show structural similarities, EPM evaluates a mixture of avoidance and escape from the open arms whereas ETM allows the examiner to distinguish between both defensive behaviors (Pinheiro et al. 2007). The highest dose of pilocarpine increased the baseline, avoidance 1 and 2 but did not alter the escape performance, suggesting an anxiogenic-like effect, since avoidance behaviors are associated with a general anxiety status and the latency to escape is thought to be related to panic disorders (Zangrossi and Graeff 1997; Pinheiro et al. 2007). As observed in the EPM test, similar results were found after the treatment with a non-convulsant dose of pilocarpine (150 but not 20 mg/kg).

In agreement with these findings, pilocarpine also promoted an anxiogenic-like effect in the OF test, as evidenced by a significant reduction of time spent in the central area and in the number of central squares crossed, whereas the number of peripheral squares crossed was not changed. The central-square exploration in the OF test represents a measurement related to the anxiety levels experienced by

rodents, whereas the exploration of peripheral areas is related to spontaneous locomotion (Ramos et al. 1997).

The cholinergic and glutamatergic system are also involved in learning and memory processes and any disturbance elicited by pilocarpine on these neurotransmitter systems could produce behavioral impairments when animals were evaluated in several tests (Torres et al. 1994; Nagao et al. 1996; Smolders et al. 1997). Our results showed that there was no change in the aversive memory formation of rats evaluated in the step-down avoidance and ETM tests 1 month after a single injection of pilocarpine (150 and 350 mg/kg). This finding is in accordance with a previous work showed that learning abilities are preserved in pilocarpine-treated rats that did not develop SE (Nieminen et al. 1992; De Mello et al. 2005).

It is suggested that theta rhythm is involved in several physiological functions like learning, memory, attention, and neural plasticity (Klimesch, 1999; Vertes, 2005). McNaughton and Gray (2000) have proposed that the theta rhythm in the septo-hippocampal system is involved in the modulation of anxious states, since lesions of the septo-hippocampal region and/or anxiolytic drug administration into it inhibit rat hippocampal theta activity (Gray and McNaughton 1983). In the present work, we showed that rats that not showed SE 1 month after the pilocarpine treatment (150 or 350 mg/kg) presented a higher incidence of theta frequency oscillations (F1) in the CA3 hippocampal region when compared to the control group. Additionally, the increased oscillations in the theta band were more pronounced in rats treated with pilocarpine at 150 mg/kg than the 350 mg/kg dose, suggesting that epileptic-like events observed 1 month after the injection of the higher dose of pilocarpine may differently affect the septo-hippocampal function by altering the hippocampal theta activity over anxiety states regulation.

Besides the absence of seizure-related episodes observed in the EEG recordings in rats treated with pilocarpine (150 mg/kg), evidence from the literature also supports the hypothesis that the behavioral effects observed are not due to silent seizures. In fact, Dos Santos et al. (2005) have shown that adult Wistar rats treated with pilocarpine (320 mg/kg), in which spontaneous recurrent seizures were not detected (but presenting silent seizures), displayed anxiolytic-like effects in the EPM test. In the same line, Cardoso et al. (2009) have recently shown that Wistar rats treated with pilocarpine (350 mg/kg), which display prolonged status epilepticus, showed less anxiety-like behavior when evaluated in the open-field and EPM tests. Additionally, a similar anxiolytic-like behavior has also been observed when rats were subjected to lithium-pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures (Syndler et al. 2005). Thus, based on the literature, the administration of pilocarpine (at doses which causes seizures—silent or not) evokes anxiolytic-like effects in the same behavioral tests

here used. In sharp contrast, we consistently showed that pilocarpine at lower doses (150 mg/kg) evoked long-term anxiogenic-like effects in Wistar rats (Duarte et al. 2010 and present work). Even though we have performed continuous 24-h EEG recordings immediately after the treatment and also 1 month later (data not shown) besides random EEG recordings along 1 month after the pilocarpine treatment, which showed no epileptic-like features in pilocarpine-treated animals, we cannot exclude a delayed epileptogenic-like effect in rats treated with the lower dose of pilocarpine (150 mg/kg) since ictal events could be present during unrecorded epochs or may be elicited long after the treatment (many months later), as observed by Navarro Mora et al. (2009) in rats injected with a high dose of pilocarpine (380 mg/kg). In this sense, additional studies are being carried out to better investigate a possible long-term epileptic effect (up to 12 months) and the affective profile of rats treated with a low dose of pilocarpine.

It is also known that convulsant doses of pilocarpine promote the release of glutamate (Cavalheiro et al. 1994) and subsequent activation of NMDA receptors and downstream events which contribute to excitotoxic damage and loss of limbic neurons (Gardoni and Di Luca 2006). Several lines of evidence point to the sclerotic hippocampus, rather than the amygdala or other temporal lobe regions, as the place of origin and maintenance of chronic seizures via glutamate excitotoxicity (Sayin et al. 2004). Thus, it has been suggested that the affective symptoms associated with epilepsy, like anxiety, are secondary to seizures (Sayin et al., 2004). However, different studies have been shown an anxiolytic-like effect in rodents as evaluated in the EPM test after SE and SRS induced by injection of pilocarpine (Dos Santos et al. 2005; Cardoso et al. 2009). On the other hand, our study revealed that rats treated with a higher dose of pilocarpine (350 mg/kg) displayed some features which are related to epilepsy 1 month after the treatment (e.g., epileptiform electrographic activity, reduction in hippocampal glutamate uptake, and cell viability), although they did not present SE and SRS during this period. Even though we cannot exclude the role of the secondary activation of glutamatergic receptors after the administration of pilocarpine in the observed anxiogenic-like responses. These data suggest that seizures and anxiety development may involve different networks or pathways and present distinct time-courses, but this observation requires further investigation.

Different from the highest dose of pilocarpine, the subconvulsant dose (150 mg/kg) did not change the biochemical parameters evaluated in the hippocampus of rats 1 month after the treatment. This means that long-lasting changes were brought about by pilocarpine, at a subconvulsant dose, are independent of alterations in glutamate uptake or hippocampal damage, and being independent of any epileptogenic activity as well. In the temporal lobe epilepsy model, the

hippocampus and amygdala are deeply affected (Turski et al. 1984), besides playing a crucial role in emotional responses (Gray and McNaughton 1983; Banneman et al. 1999; Degroot and Treit 2002). Specific neurons of the hippocampus and amygdala project widely to groups of cells that participate in the physiological and behavioral responses associated with anxiety (Millan 2003). Additionally, Gray and McNaughton's theory (1983) highlight the septo-hippocampal circuitry as critically involved in the regulation of fear and anxiety states through the overstimulation of cholinergic inputs in these limbic areas. Since our results, after the treatment with a subconvulsant dose of pilocarpine, did not show any molecular/biochemical change in the hippocampus besides the increased oscillation of theta activity 1 month after the treatment, additional studies are required to better investigate the possible involvement of the hippocampus, as well as the amygdala, in that response.

In conclusion, we suggest that a single systemic injection of pilocarpine at subconvulsant doses induces long-lasting defensive behaviors related to anxiety in rats and these behavioral changes are not associated to a hippocampal damage since the cell viability assay did not indicate any neuronal death. The anxiogenic-like effects induced by pilocarpine are positively correlated to the increased theta activity in the hippocampus. Additionally, bearing in mind the limitations of translating the psychological domains of psychiatric diseases to animal equivalents, the results shown here may help to further refine preclinical research related to anxiety disorders.

Acknowledgments A.A. Hoeller and M. Duzioni are recipients of PhD fellowship from CAPES and CNPq, respectively. N.M. Silva has a PIBIC fellowship from CNPq which also provided research grants to F. S. Duarte, E.C. Gavioli, C.I. Tassa, A.P. Carobrez and T.C.M. De Lima. The authors would like to thank Dr. Gareth Curdie for final English revision of the text.

References

- Adamec RE (1990) Amygdala kindling and anxiety in the rat. *Neuroreport* 1(3–4):255–258
- Adamec RE, Morgan HD (1994) The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol Behav* 55(1):1–12
- Adamec R, Shallow T, Burton P (2005) Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. *Behav Brain Res* 159:73–88
- Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN (1999) Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav Neurosci* 113(6):1170–1188
- Barras DM, Ramirez MR, Izquierdo I (2005) Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83(2):113–118
- Beyenburg S, Mitchell AJ, Schmidt D, Elger CE, Reuber M (2005) Anxiety in patients with epilepsy: systematic review and suggestions for clinical management. *Epilepsy Behav* 7(2):161–171
- Cardoso A, Carvalho LS, Lukyanova EA, Lukyanova NV (2009) Effects of repeated electroconvulsive shock seizures and pilocarpine-induced status epilepticus on emotional behavior in the rat. *Epilepsy Behav* 14(2):293–299
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bottoletto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32(6):778–782
- Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffih-Mazzacconi MG (1994) Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. *Epilepsia* 35(1):1–11
- Cavalheiro EA (1995) The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* 16(1–2):33–37
- Cole JC, Rodgers RJ (1994) Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the mouse elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 114(2):288–296
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172(2):143–157
- De Mello N, Carobrez AP (2002) Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharmacol* 13(2):139–148
- De Mello N, Souza-Junior IQ, Carobrez AP (2005) Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. *Behav Brain Res* 158(2):263–268
- Degroot A, Treit D (2002) Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res* 949(1–2):60–70
- Detour J, Schroeder H, Desor D, Nehlig A (2005) A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia* 46(4):499–508
- Devinsky O (2004) Therapy for neurobehavioral disorders in epilepsy. *Epilepsia* 45(2):34–40
- Dos Santos JG, Longo BM Jr, Blanco MM, Menezes de Oliveira MG, Mello LE (2005) Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 1066:37–48
- Duarte FS, Gavioli EC, Duzioni M, Hoeller AA, Cantans NS, De Lima TC (2010) 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 (Berl)* 212:653–661
- Duarte FS, Mauder M, Hoeller AA, Duzioni M, Mendes BG, Pizzolatti MG, De Lima TC (2008) Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology (Berl)* 197(3):351–360
- Gardoni F, Di Luca M (2006) New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol* 545(1):2–10
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C (1993) The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 26(1):67–70
- Gray JA, McNaughton N (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 7:119–188
- Gröckle I, Hoffman K, Löscher W (2007) Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol* 207(2):329–349
- Hannesson DK, Howland JG, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Coxoran ME (2005) Anesthetized penitral cortex kindling produces long-lasting effects on anxiety and object recognition memory. *Eur J Neurosci* 21(4):1081–1090

- Haut SR, Hall CB, Masur J, Lipton RB (2007) Seizure occurrence: precipitants and prediction. *Neurology* 69(20):1905–1910
- Heller V, Deransart C, Mareaux C, Depaulis A (1996) Amygdala kindling in the rat: anxiogenic-like consequences. *Neuroscience* 73(4):971–978
- Jackson MJ, Turkington D (2005) Depression and anxiety in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(1):45–47
- Kalynchuk LE, Pinel JP, Treit D, Kippin TE (1997) Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol Psychiatry* 41(4):438–451
- Klimesch W (1999) EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev* 29:169–195
- Leite JP, Nakamura EM, Lemos T, Masur J, Cavalheiro EA (1990) Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain J Med Biol Res* 23(8):681–683
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61:161–176
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Prestoris JK, Babb TL, Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34(6):985–995
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70(2):83–244
- Molz S, Decker H, Oliveira JJ, Souza DO, Tasca CI (2005) Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem Res* 30(1):83–89
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1–2):55–63
- Nagao T, Alonso A, Avoli M (1996) Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience* 72(2):399–408
- Navarro Mora G, Bramanti P, Osculati F, Chakir A, Nicolato E, Marzola P, Sbarbati A, Fabene PF (2009) Does pilocarpine-induced epilepsy in adult rats require status epilepticus? *PLoS One* 4(6):e5759
- Nieminen SA, Sirviö J, Teittinen K, Pitkänen A, Airaksinen MM, Riekkinen P (1992) Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. *Physiol Behav* 51(4):845–849
- Oliveira JJ, Molz S, Souza DO, Tasca CI (2002) Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 22(3):335–344
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3):149–167
- Pinheiro SH, Zangrossi Jr H, Del-Ben CM, Graeff FG (2007) Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *An Acad Bras Cienc* 79:71–85
- Ramos A (2008) Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *TIPS* 29:493–498
- Ramos A, Berton O, Mormede P, Cahoulloff F (1997) A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 85(1):57–69
- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801–810
- Romcy-Pereira RN, de Araujo DB, Leite JP, Garcia-Cairasco N (2008) A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and coherence analysis. *J Neurosci Methods* 167:384–392
- Rossetti F, Rodrigues MCA, Marroni SS, Fernandes A, Foresti ML, Romcy-Pereira RN, de Araujo DB, Garcia-Cairasco N (2012) Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigro-tectal pathway in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain II: An EEG wavelet analysis and retrograde neuronal tracer approach. *Epilepsy Behav* 24(4):391–398
- Sayin U, Satala TE, Stafitson CE (2004) Seizures in the developing brain cause adverse long-term effects on spatial learning and anxiety. *Epilepsia* 45(12):1539–1548
- Smolens I, Khan GM, Manji J, Ehinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 121(6):1171–1179
- Snyderler J, Wierzba-Bohrowicz T, Skózniewska A, Maciejak P, Walkowiak J, Lechowicz W, Tuzyska D, Bidziński A, Płaznik A (2005) Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. *Pharmacol Biochem Behav* 81(1):15–23
- Torres EM, Perry TA, Blockland A, Wilkinson LS, Wiley RG, Lappi DA, Dunnett SB (1994) Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience* 63:95–122
- Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983a) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 39(12):1408–1411
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983b) Limbic seizures produced by pilocarpine in mice: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9(3):315–335
- Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L (1984) Seizures induced by pilocarpine in mice: a behavioural, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res* 321(2):237–253
- Turski L, Cavalheiro EA, Czuczwar SJ, Turski WA, Kleinrok Z (1987) The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents. *Pol J Pharmacol Pharm* 39(5):545–555
- Vertes RP (2005) Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus* 15:923–935
- Wall PM, Messier C (2000) U-69,593 microinjection in the infralimbic cortex reduces anxiety and enhances spontaneous alternation memory in mice. *Brain Res* 856(1–2):259–280
- Zangrossi H Jr, Graeff FG (1997) Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull* 44(1):1–5

APÊNDICE B – Artigo publicado relacionado à tese

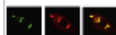
HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; DUARTE, F.S.; LEME, L.R.; COSTA, A.P.R.; SANTOS, E.C.S.; DE PIERI, C.H.; DOS SANTOS, A.A.; NAIME, A.A.; FARINA, M.; DE LIMA, T.C.M. *GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. **Brain research***, manuscrito aceito, 2013.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety

Alexandre Ademar Hoeller^a, Marcelo Duzzioni^b, Filipe Silveira Duarte^c,
Leandro Rinaldi Leme^a, Ana Paula Ramos Costa^a,
Evelyn Cristina da Silva Santos^a, Claudini Honório de Pieri^a,
Alessandra Antunes dos Santos^d, Aline Aita Naime^d, Marcelo Farina^d,
Thereza Christina Monteiro de Lima^{a,*}

^aLaboratory of Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences (CCB), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88049-900, Brazil

^bLaboratory of Neuropharmacology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceió, AL 57020-720, Brazil

^cLaboratory of Experimental Neuropharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil

^dLaboratory of Biochemistry, Department of Biochemistry, CCB, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88049-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 25 July 2013

Keywords:

Anxiety
Pilocarpine
Diazepam
Pentylenetetrazole
Elevated plus-maze
Electroencephalogram

ABSTRACT

The cholinergic system is implicated in emotional regulation. The injection of non-convulsant doses of the muscarinic receptor agonist pilocarpine (PILo) induces long-lasting anxiogenic responses in rats evaluated at different time-points (24 h to 3 months). To investigate the underlying mechanisms, rats treated with PILo (150 mg/kg) were injected 24 h or 1 month later with an anxiolytic (diazepam, 1 mg/kg, DZP) or anxiogenic (pentylenetetrazole, 15 mg/kg, PTZ) drug and evaluated in the elevated plus-maze (EPM). Prefrontal cortex (PFC) and hippocampal (HIP) electroencephalographic recordings and acetylcholinesterase (AChE) activity were also analyzed after PILo treatment. Anxiogenic responses observed in the EPM 24 h or 1 month after PILo treatment (e.g., decreased time spent and number of entries into the open arms of the maze) were blocked by DZP but not affected by PTZ. No epileptiform events were registered in the HIP or PFC at 24 h or 1 month after PILo injection, but enhanced theta activity was observed in the HIP. DZP decreased hippocampal theta of PILo-treated rats in contrast with PTZ, which increased this parameter in saline- and PILo-treated rats. The HIP and PFC AChE activity did not change after PILo treatment. Our findings demonstrate that the long-term effects on the emotionality of rats induced by PILo are associated with electrophysiological changes in

Abbreviations: (HIP), hippocampus; (PFC), prefrontal cortex; (PILo), pilocarpine; (DZP), diazepam; (BDZ), benzodiazepine; (PTZ), pentylenetetrazole; (EEG), electroencephalogram

*Correspondence to: Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences (CCB), Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil. Fax: +55 48 3721 9813.

E-mail addresses: thereza.lima@ufsc.br, t.de_lima@hotmail.com (T.C.M. de Lima).

0006-8993/\$ - see front matter © 2013 Published by Elsevier B.V.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.045>

Please cite this article as: Hoeller, A.A., et al., GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. *Brain Research* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.045>

the HP and sensitive to pharmacological manipulation of the GABAergic system. The present work may support this new research model of long-lasting anxiety, while also highlighting the muscarinic system as a potential target involved in anxiety disorders.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Scientific research on the treatment of emotional disorders has significantly increased over the past few decades (Farach et al., 2012), although the most studied anxiolytic drugs tested in experimental and clinical trials — mainly GABA, glutamate, 5-HT, and neuropeptide receptor modulators (Christmas et al., 2008) — are still prone to induce tolerance impairments and specific side effects during the treatment (Nutt, 2005; Pollack et al., 2008). In this sense, the investigation of new approaches and different cellular mechanisms involved in fear and anxiety responses are still needed. Several pieces of evidence have demonstrated the role of the cholinergic system over the regulation of limbic structures and therefore the behavioral responses involved in these emotional states (Acquas et al., 1996; Degroot and Treit, 2003; Duarte et al., 2010; Graf et al., 2011).

Gray and McNaughton proposed from studies carried out with specific lesions/inactivation and pharmacological manipulation that both the hippocampus and septum work in concert to regulate anxiety through the activation of cholinergic afferents that act over the limbic system (Gray and McNaughton, 2000; Gray and McNaughton, 1983). Mainly, changes in septo-hippocampal function and theta activity could underlie normal and the pathological process associated with anxiety once lesions of this system or the administration of anxiolytic drugs into this site may inhibit the hippocampal theta rhythm of rats (Gray and McNaughton, 1983; McNaughton and Gray, 2000). Accordingly, our research group has proposed that the administration of non-convulsant doses of pilocarpine (PILo), a non-selective muscarinic receptor agonist, presents a useful model to investigate long-term anxiety (Duarte et al., 2010; 2013). Rats treated with PILo (150 or 350 mg/kg) exhibit an anxious profile when evaluated in the elevated plus-maze (EPM) test 24 h after treatment for up to 3 months (Duarte et al., 2010; 2013). Moreover, temporary inactivation of the fimbria abolished the anxiogenic responses elicited by PILo in rats evaluated 1 month after treatment, suggesting the participation of a direct path from the hippocampus to medial hypothalamic sites involved in these fear responses (Duarte et al., 2010).

To better understand the underlying mechanisms elicited by the activation of muscarinic cholinergic receptors, we studied the acute and long-term pharmacological profile of PILo-induced anxiety in rats and the sensitivity of the GABA-A receptor modulation in the observed responses. We evaluated the behavioral effects of the standard anxiolytic and anxiogenic drugs, diazepam (DZP, 1 mg/kg) and pentylenetetrazole (PTZ, 15 mg/kg), respectively, in rats treated with a non-convulsant dose of PILo (150 mg/kg), and evaluated in the EPM test 24 h or 1 month later. The acetylcholinesterase (AChE) activity in the hippocampus (HIP) and prefrontal cortex (PFC) was assessed in an attempt to establish any correlations with

acetylcholine action in these areas of the brain, as well as its activity per se that is inversely correlated with trait anxiety in human beings (Sklan et al., 2004). Furthermore, electroencephalogram (EEG) recordings in the HIP and PFC areas were carried out to investigate the occurrence of epileptiform activity induced by PILo, in addition to quantification of the theta rhythm activity (4–8 Hz), which is recorded in the HIP and adjacent structures and controlled by neurons located in the medial septal area that receives inputs from the midbrain, thereby coupling fear conditioning and anxiety responses (Adhikari et al., 2010; Sangha et al., 2009).

2. Results

2.1. Behavioral sensitivity of PILo-treated rats injected with DZP or PTZ and evaluated in the EPM test

The effects of DZP and PTZ treatments on the behavior of rats evaluated in the EPM test 24 h or 1 month after PILo treatment (see treatment protocol in Figs. 1 and 2A) were analyzed with a two-way ANOVA test using the "pretreatment" (PT) and "treatment" (T) as factors. Accordingly, DZP increased the time spent on the open arms of the maze, whereas PTZ decreased this parameter in rats pretreated with saline 24 h [T:F(2,42) = 59.52; $p < 0.000001$; and PT × T:F(2,42) = 9.37; $p < 0.001$] and 1 month after the treatment [PT:F(1,42) = 6.69; $p < 0.05$; T:F(2,42) = 26.58; $p < 0.000001$; and PT × T:F(2,42) = 6.18; $p < 0.01$]. Furthermore, the injection of PTZ decreased the number of entries on the open arms [T:F(2,42) = 15.43; $p < 0.00001$; and PT × T:F(2,42) = 3.25; $p < 0.05$], entries into enclosed arms [T:F(2,42) = 5.17; $p < 0.01$] and head dipping behavior [T:F(2,42) = 27.56; $p < 0.000001$] 24 h after treatment. The injection of DZP increased the number of head dipping behavior instances 1 month after the treatment [PT:F(1,42) = 6.34; $p < 0.05$; T:F(2,42) = 19.58; $p < 0.000001$; and PT × T:F(2,42) = 4.42; $p < 0.05$], in addition to enhancing the number of entries into open arm's extremities. PTZ reduced this parameter 24 h [T:F(2,42) = 59.24; $p < 0.000001$; and PT × T:F(2,42) = 11.01; $p < 0.001$] and 1 month [PT:F(1,42) = 11.41; $p < 0.001$; T:F(2,42) = 24.80; $p < 0.000001$; and PT × T:F(2,42) = 5.77; $p < 0.01$] after the injection of saline (Figs. 1 and 2).

The injection of saline in PILo-treated rats decreased the time spent and the number of entries on the open arms 24 h and 1 month after treatment [T:F(2,42) = 16.28; $p < 0.00001$; and PT × T:F(2,42) = 4.01; $p < 0.05$], as well as the number of head dipping behavior instances and the exploration of open arm's extremities besides increased the number of protected stretch-attend postures 24 h [PT:F(1,42) = 7.57; $p < 0.01$; T:F(2,42) = 8.19; $p < 0.001$; and PT × T:F(2,42) = 3.65; $p < 0.05$] and 1 month after the treatment [PT:F(1,42) = 22.22; $p < 0.0001$; and T:F(2,42) = 8.85; $p < 0.001$] when compared to the control group. Furthermore, PILo-treated rats did not

144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203

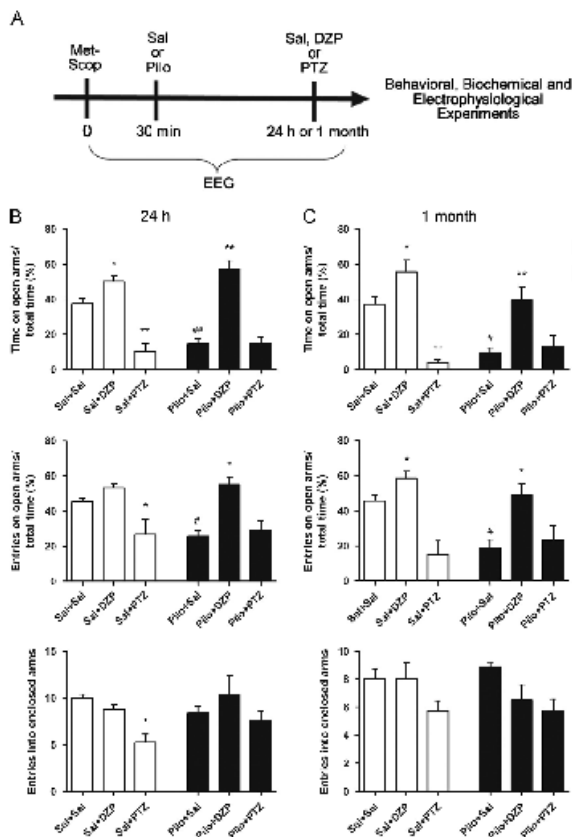


Fig. 1 – (A) Outline of the treatments and experimental schedule: methylscopolamine (Met-Scop, 1 mg/kg), saline (Sal, 0.9%), pilocarpine (Pilo, 150 mg/kg), diazepam (DZP, 1 mg/kg), and pentylenetetrazole (PTZ, 15 mg/kg). (B–C) Effects of diazepam or pentylenetetrazole on classic behavioral parameters of rats evaluated in the elevated plus-maze test 24 h or 1 month after treatment with saline or pilocarpine. Values are represented by the mean \pm S.E.M. of 8 animals per group. * $p \leq 0.05$ or ** $p \leq 0.001$ as compared with the control group (saline injection of respective groups). # $p \leq 0.05$ or ## $p \leq 0.001$ as compared to saline injection in saline-treated group. Comparisons were made by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls's test.

show any differences in the number of entries into enclosed arms of the EPM (Figs. 1 and 2).

When injected 24 h or 1 month after PILO treatment, the injection of DZP reversed the PILO-induced anxiogenic effects in the following parameters: the time spent, the number of

entries on the open arms, decreasing the number of protected stretched-attend postures, and increasing the head dipping behavior instances and number of the entries into open arm's extremities when compared to rats that received saline after the treatment with PILO (Figs. 1 and 2). PTZ

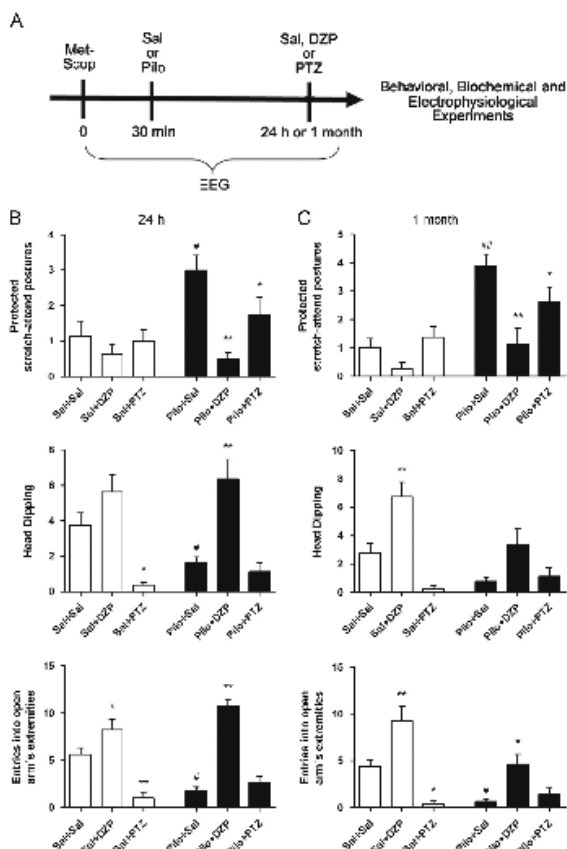


Fig. 2 - (A) Outline of the treatments and experimental schedule: methyisopropamine (Met-Scop, 1 mg/kg), saline (Sal, 0.9%), pilocarpine (Pilo, 150 mg/kg), diazepam (DZP, 1 mg/kg), and pentyleneetetrazole (PTZ, 15 mg/kg). (B-C) Effects of diazepam or pentyleneetetrazole on ethologic behavioral parameters of rats evaluated in the elevated plus-maze test 24 h or 1 month after treatment with saline or pilocarpine. Values are represented by the mean ± S.E.M. of 8 animals per group. * $p \leq 0.05$ or ** $p \leq 0.001$ as compared to the control group (saline injection of respective groups). * $p \leq 0.05$ or ** $p \leq 0.001$ as compared to saline injection in saline-treated group. Comparisons were made by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls's test.

treatment in FLO-treated rats only decreased the number of protected stretched-attend postures. Moreover, the injection of either DZP or PTZ after FLO treatment did not alter the number of entries into the enclosed arms of the EPM (Figs. 1 and 2).

2.2. Effects of DZP or PTZ injection on HIP and PFC AChE activity of FLO-treated rats

As observed in Table 1, FLO injection per se, as well as injections of DZP or PTZ, did not change AChE activity in the

264 PFC and HP measured 24 h or 1 month after treatments,
265 pointing to the non-correlation between the cholinergic
266 enzymatic activity in these structures and the anxiogenic
267 responses observed in the behavioral tests.
268

2.3. Theta rhythm activity after DZP or PTZ injection in PILO-treated rats

272 As illustrated in Fig. 3, EEG recordings of the PFC and HP were
273 made prior to drug injections (baseline), whereas the injection
274 of methyl-scopolamine did not promote any EEG
275 abnormalities through visual inspection of any group (data
276 not shown). Likewise, saline injection in saline-treated rats

showed similar tracings when observed 24 h or 1 month later
when compared to baseline recordings (Fig. 3A). EEG traces
did not show any epileptiform events (e.g., sharp waves or
spike-wave discharges) after the injection of PILO (150 mg/kg),
and were characterized by the incidence of low amplitudes
and fast activity in both the PFC and HP regions. The
injection of PTZ in saline- or PILO-treated rats rapidly elicited
a hypo-responsive behavior (e.g., immobility state) associated
with low frequencies and high amplitude discharges in the
HP area spreading to the cortical region (Fig. 3). These
epileptiform activities were not associated with convulsive
behaviors since we did not observe any myoclonic or general-
ized motor manifestations in any group. Furthermore, the

Table 1 – Effects of diazepam (DZP, 1 mg/kg, i.p.) and pentylenetetrazole (PTZ, 15 mg/kg, i.p.) 24 h or 1 month after the treatment of pilocarpine (PILO, 150 mg/kg, i.p.) on acetylcholinesterase (AChE) activity in the hippocampus (HIP) and prefrontal cortex (PFC) of rats.

Treatments	HIP		PFC	
	24 h	1 month	24 h	1 month
SAL+SAL	5.78 ± 0.35	2.98 ± 0.51	2.98 ± 0.51	2.80 ± 0.58
PILO+SAL	5.87 ± 0.29	5.53 ± 0.19	3.11 ± 0.61	2.05 ± 0.44
SAL+DZP	7.06 ± 0.86	6.09 ± 0.46	4.00 ± 0.85	3.85 ± 0.91
PILO+DZP	6.12 ± 0.50	5.85 ± 0.34	3.74 ± 0.60	2.11 ± 0.43
SAL+PTZ	7.40 ± 0.39	6.72 ± 0.26	2.98 ± 0.61	3.04 ± 0.59
PILO+PTZ	6.33 ± 0.56	5.61 ± 0.21	3.55 ± 0.50	2.40 ± 0.57

Values are expressed as mean ± S.E.M. of 8 animals per group.

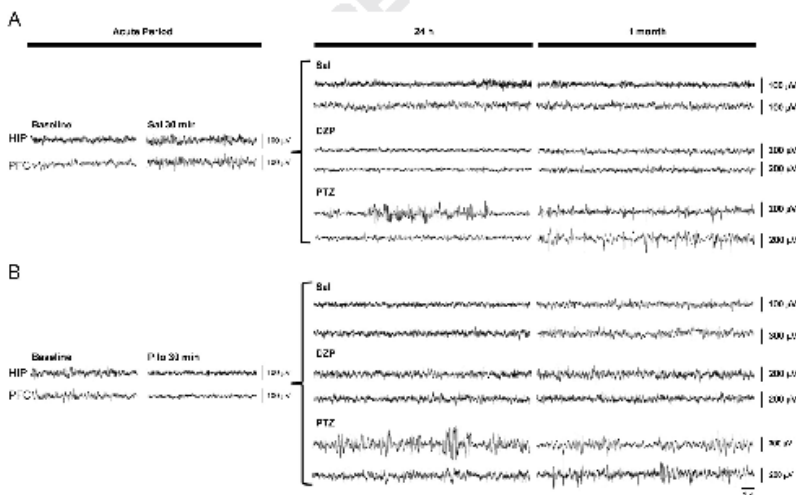


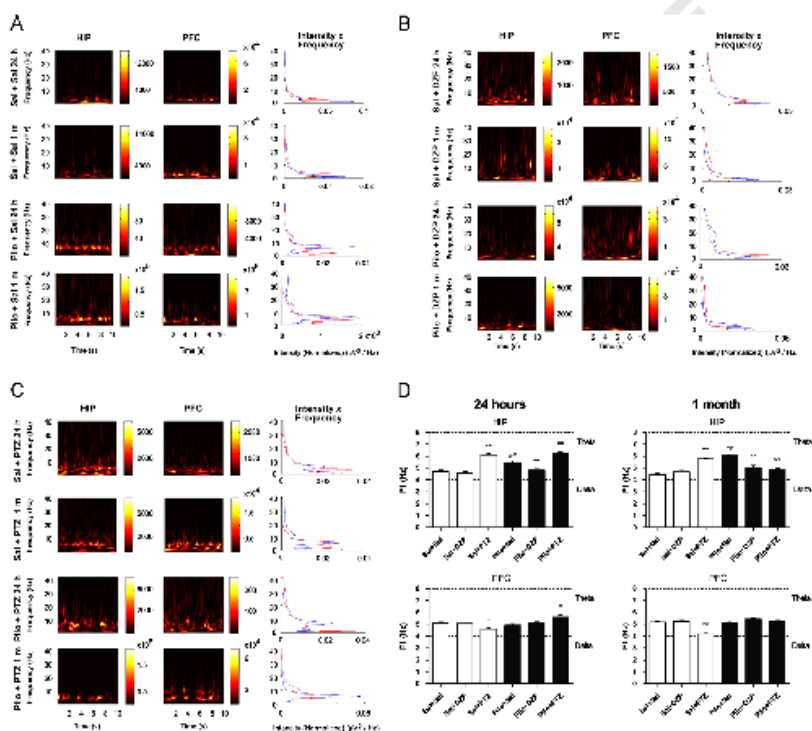
Fig. 3 – Effects of diazepam (DZP, 1 mg/kg) or pentylenetetrazole (PTZ, 15 mg/kg) on electroencephalogram (EEG) traces of rats recorded 24 h or 1 month after the treatment with (A) saline (Sal, 0.9%) or (B) pilocarpine (Pilo, 150 mg/kg). Representative EEG recordings (15- to 25-s epochs) from hippocampal (HIP, upper) and cortical (PFC, bottom) areas are shown.

Please cite this article as: Hoeffer, A.A., et al., GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. *Brain Research* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.045>

324 injection of DZP elicited mild alterations in the EEG with the
 325 incidence of slow activity waves 24 h or 1 month after saline
 326 or Pilo treatments (Fig. 3).

327 As observed in Fig. 4, wavelet analysis shows a representative
 328 view of the hippocampal and cortical EEG after DZP or PTZ
 329 injections in saline- and Pilo-treated rats (Fig. 4A-C). Quantita-
 330 tive EEG analysis reveals that Pilo-treated rats presents a
 331 significant increase in the incidence of theta range (4–8 Hz, F1
 332 oscillation) in the HIP 24 h [F-T-F(1,654)=15.72; $p < 0.0001$; T-F
 333 (2,654)=80.29; $p < 0.000001$; and PT × T-F(2,654)=3.93; $p < 0.05$]
 334 and 1 month after the treatments [F-T-F(1,694)=11.59; T-F

(2,694)=6.90; $p < 0.01$; PT × T-F(2,694)=41.90; $p < 0.000001$ and
 335 discrepant changes in the PFC region 24 h [F-T-F(1,654)=8.58;
 336 $p < 0.01$; PT × T-F(2,654)=11.96; $p < 0.00001$ and 1 month after
 337 treatments [F-T-F(1,694)=16.21; $p < 0.0001$; T-F(2,694)=15.42;
 338 $p < 0.000001$; and PT × T-F(2,694)=11.72; $p < 0.00001$, (Fig. 4B)].
 339 The injection of DZP does not alter the incidence of hippocampal
 340 theta activity in saline-treated rats but decreases the hippocampal
 341 rhythm in Pilo-treated rats 24 h or 1 month after the
 342 treatment when compared to the control group. PTZ significantly
 343 increased the incidence of hippocampal theta activity in saline-
 344 treated rats and a biphasic effect in Pilo-treated rats (increased



376 Fig. 4 – Effects of diazepam (DZP, 1 mg/kg) or pentylenetetrazole (PTZ, 15 mg/kg) on the first most prominent frequency (F1)
 377 during recordings in the hippocampus (HIP) and prefrontal cortex (PFC) of rats treated 24 h or 1 month after saline (Sal, 0.9%) or
 378 pilocarpine (Pilo, 150 mg/kg). (A–C) Representative EEG activity in the HIP and PFC with the (D) respective wavelet analyses
 379 during a quiet behavior state. The component frequencies (in Hz) of the trace and their intensities ($\mu V^2/Hz$) are plotted on the
 380 frequency \times intensity graphs in which the power of the spectrum is represented as calibration bars within each graph. Hot
 381 colors correspond to greater intensity values in each frequency. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ as compared to the control group (saline
 382 injection of respective groups) and *** $p < 0.001$ as compared to saline injection in saline-treated group. Comparisons were
 383 made by two-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls' test.

Please cite this article as: Hoeller, A.A., et al., GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm
 in an animal model of long-lasting anxiety. Brain Research (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.045>

24 h after, but decreased 1 month after the treatment). Furthermore, cortical theta activity is decreased by PTZ in saline-treated rats and increased 24 h after FILO treatment (Fig. 4D).

3. Discussion

Following up on our previous findings in which the activation of central cholinergic receptors by the injection of non-convulsant doses of FILO enhanced the anxious state of rats evaluated in several anxiety-related behavior tests (Duarte et al., 2010; 2013), the present study shows that these elicited long-term responses are differentially sensitive to GABA-A receptor modulation. Furthermore, we provide evidence that FILO effects are not associated with any electrographic or behavioral epileptiform activity aside from an increased theta rhythm incidence, which is differentially sensitive to standard GABA-A receptor drugs (i.e., DZP and PTZ) often used to explore the underlying mechanisms involved in fear and anxiety phenomenon (Carobrez and Bertoglio, 2005; Duarte et al., 2010; File et al., 1998; Inks and McGregor, 1997; Jung et al., 2002; Lacroix et al., 2000; Little, 1991).

Some studies on the function of the GABA-A/BDZ receptor complex in anxiety disorders have hypothesized that changes in the conformation of this receptor or in the concentration or properties of an endogenous ligand could contribute to the pathological symptoms of anxiety (Chamey, 2003). In this sense, patients with anxiety disorders show a reduced GABA-A/BDZ sensitivity during treatment with GABA-A receptor agonists (Nutt et al., 1990; Roy-Byrne et al., 1996). Furthermore, intravenous (Nutt et al., 1990) or oral administration (Woods et al., 1991) of flumazenil, an antagonist of the GABA-A/BDZ site receptor, promotes panic attacks and increases the anticipatory anxiety in some patients with panic disorder but not in healthy individuals. Moreover, the sensitivity to DZP effects in the saccadic eye velocity is abnormally reduced, implying that the functional sensitivity of the GABA-A receptor is attenuated in regions that control these movements (e.g., PFC, the superior colliculus, cerebellum, brainstem reticular formation) (Roy-Byrne et al., 1996).

The EPM test was chosen to investigate the behavioral effects elicited by FILO due to its extensive use in drug screening experiments (Fellow, 1985; Fellow and File, 1986). On this test, drugs that act by enhancing GABA neurotransmission are prone to increase the time spent and number of entries into the open arms of the maze (Cruz et al., 1994; Fellow and File, 1986), whereas drugs that decrease GABA signaling reduce the time spent on the open arms (Cruz et al., 1994; File and Lister, 1984; Jung et al., 2002; Fellow and File, 1986). Here we demonstrate that the administration of DZP inhibited the anxiogenic-like behaviors of rats injected with FILO and evaluated 24 h or 1 month later in the EPM test, similar to responses observed in saline-treated rats that also received DZP 24 h or 1 month after treatment. In contrast, PTZ treatment failed to alter the behavioral responses elicited by FILO, suggesting the promotion of a maximal anxiogenic response observed in this group or due to its epileptogenic properties observed immediately after injection during EEG recordings. Importantly, alterations in locomotor activity in FILO-treated rats were not detected since there was no

differences in the entries into enclosed arms of the maze (a parameter related to locomotor activity) or the number of squares crossed in the open-field test (data not shown). PTZ injection in saline-treated rats reduced the number of entries into enclosed arm of the maze. Important to note, this effect was previously observed by Fellow and File (1986) which described these response as a generalized defensive behavior reaction according to analysis of covariance, in this way, also ruling out any nonspecific effect caused by the treatments used in the present study.

Unlike the observed after the injection of an anxiogenic dose of FILO, the administration of PTZ in saline- or FILO-treated rats rapidly elicited high voltage slow wave discharges on the first minute after PTZ injection during EEG recordings of the HIP and PFC areas, suggesting that anxiety-like responses observed in FILO-treated rats proved to be independent of electrographic seizures, different to what is usually observed in the anxiety-induced kindling or PTZ preparations (Adamec, 1990; Adamec and Morgan, 1994; Cavalli et al., 2009; Cruz et al., 1994).

Researchers have been investigating the relationship between muscarinic activation and specific network oscillations, such as theta rhythm, in cholinergic-sensitive limbic structures that respond in a synchronized way (Friedman et al., 2007; Garrido Sanabria et al., 2006; Richter et al., 1999). The theta rhythm is involved in several physiological functions such as learning, memory, attention, and neural plasticity (Klimesch, 1999; Quintero et al., 1985; Vertes, 2005). Additionally, increased temporal synchronization of theta rhythm is also enhanced during fear responses (Lesting et al., 2011) and anxiety states (Adhikari et al., 2010; Adhikari et al., 2011), supporting the main role of theta synchrony on the modulation of these states. Interestingly, the theta activity was not changed after DZP injection in saline-treated rats, in disagreement with pioneer studies that have reported the effects of several anxiolytic drugs (e.g., barbiturates and benzodiazepines) in decreasing hippocampal theta activity (Gray et al., 1975; McNaughton and Sedgwick, 1978; Mellanby et al., 1981; Quintero et al., 1985). Such effects may be due to the analysis of theta rhythm in rats during a quiet state behavior, which also favored decreased theta activity in rats injected with saline. On the other hand, DZP injection significantly decreased the hippocampal theta activity of FILO-treated rats 24 h or 1 month after the treatment, supporting the anxiogenic behavioral effects previously observed. Additionally, PTZ injection increased theta activity in the HIP of saline- and FILO-treated rats whereas contrasting effects were observed in the PFC area (decreased and increased activity in saline- and FILO-treated rats respectively).

Little is known about the effects of GABA-A receptor antagonists on theta activity of rats although FG 7142, a GABA-A/BDZ partial inverse agonist, enhanced theta oscillation of septal neurons and hippocampal theta activity (Hajós et al., 2004), whereas the blockage of GABA-A and GABA-B receptors facilitated theta activity induced by carbachol, a cholinergic receptor agonist (Konopacki et al., 1997). In this way, we confirm the importance of the GABAergic receptors in regulating network oscillations possibly through inhibitory interneurons that act on theta oscillations (Buzsáki et al., 1983;

Leung, 1998; Leung and Shen, 2007) and their pivotal interaction with cholinergic (muscarinic receptors) neurons implicated in the theta rhythm genesis. Thus, we hypothesized that temporary changes in hippocampal theta rhythm triggered by a non-convulsant dose of PILO may be involved in the anxiogenic manifestation observed in this study, also in resemblance to humans who self-report an enhanced anxiety during threat and that, consequently, present an increased hippocampal theta activity during stimulus (Cornwell et al., 2012).

Additionally, AChE activity plays a major role in the regulation of cholinergic function at synapses (Soreq and Seidman, 2001; Zimmerman and Soreq, 2006) and can be an important tool for understanding anxiety-like behaviors in animal models (Dori et al., 2011). Anxiety measures assessed in healthy subjects showed that serum AChE activity is inversely correlated with trait anxiety, but not with state anxiety, suggesting a trait-anxiety-predictive role of serum AChE activity (Sklan et al., 2004). Furthermore, the intra-septal injection of the cholinergic immunotoxin 192-IgG-saporin decreased AChE activity in the HIP, septum, and PFC area with no alteration in the behavior of rats evaluated in the EPM test (Lamprea et al., 2000), showing that damaged cholinergic input on forebrain structures may alter acetylcholine activity in these areas but not directly impairs anxiety responses of rats during experimental anxiety tests. Our results did not show any significant differences in the AChE activity in the HIP or PFC tissues 24 h or 1 month after the injection of PILO suggesting that AChE activity seems not to be sensitive to anxiety responses since both treatments (DZP or PTZ) also did not change the enzymatic activity in the studied areas. In contrast, Schetinger et al. (2000) showed that AChE activity in the cerebral cortex of rats is decreased after administration of DZP, whereas increased levels of hippocampal AChE activity was observed after administration of FG 7142 to mice, which did not present seizures (Appleby et al., 1990). In this way, it is possible that the experimental protocol presented here is not sensitive to the AChE assay or that the anxiogenic-like responses induced by the administration of PILO may be independent from the AChE activity in the HIP or PFC tissues.

Wall et al. (2001) showed that an increased acetylcholine transmission in the ventromedial PFC induces anxiety in CD-1 mice and the injection of pirenzepine (an M1 receptor antagonist) evoked anxiolytic-like responses; whereas McN-A-343 (an M1 receptor agonist) presented anxiogenic-like effects, suggesting that the cholinergic activity on the forebrain-medial prefrontal cortex may exert a pivotal role in anxiety regulation, especially by M1 postsynaptic receptors (Wall et al., 2001). Likewise, the anxiogenic profile observed here after the injection of PILO is in agreement with previous findings of our research group showing that different doses of PILO (150 or 350 mg/kg) induced anxiogenic responses observed in rats 24 h up to 3 months after treatment (Duarte et al., 2010; 2013).

Q3 Additionally, according to our findings and Gray and McNaughton (1983) theory, anxiety responses are significantly regulated by overstimulated cholinergic inputs on limbic areas (e.g., septo-hippocampal system). Information about EEG patterns (i.e., theta rhythm) of neurons that are directly linked to the modulation of anxiety states could

provide better evidence for the role of the cholinergic system in controlling emotional responses observed in rodents because the hippocampal theta rhythm, modulated by cholinergic pathways, exerts a "pacemaker" function upon the septo-hippocampal system in controlling anxiety (Gray and McNaughton, 2000), suggesting according to our data that temporary changes in the hippocampal rhythm triggered by PILO injection may be involved in the long-term anxiogenic responses.

4. Conclusion

Coupled with our previous reports that a single systemic non-convulsant dose of PILO trigger long-lasting emotional changes in adult rats evaluated in several anxiety-related tests (Duarte et al., 2010; 2013), the results shown here associate the anxious-like state observed in rats treated with PILO with electrophysiological changes in the HIP (enhanced theta activity) and sensitivity to systemic pharmacological manipulation of the GABAergic system with no alteration of the cholinergic activity of the HIP or PFC areas. These results give support to a new research strategy in the investigation of long-term anxiety mechanisms in rats, in addition to highlighting the muscarinic system as a putative target to future translational studies.

5. Experimental procedures

5.1. Animals

Adult male Wistar rats (2-3 months old, weighing 200-300 g) were housed in groups of four per cage and kept in a room with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12:12 light-dark cycle (lights on at 0700) with free access to food and water, except during the experiments. Rats were allowed to adapt to the laboratory conditions for at least 1 week before the experiments. Behavioral experiments were carried out during the light phase of the cycle (between 1300 and 1800). All experiments were conducted in accordance with international standards of animal welfare recommended by Brazilian Law (#11.794-10/08/2008) and approved by the local Committee for Ethics in Animal Research (CEUA-UFSC, #23080.025-621/2009-03).

5.2. Elevated plus-maze (EPM) test

The EPM apparatus (EP151, Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brazil) was made of wood and consisted of two opposing open arms ($50 \times 10 \text{ cm}^2$) and two opposing enclosed arms ($50 \times 10 \text{ cm}^2$) mounted at an angle of 90° , all facing a central platform ($10 \times 10 \text{ cm}^2$), elevated 40 cm from the floor. To prevent falls, the open arms were surrounded by a 1-cm high acrylic rim. The apparatus was placed in a small closed room lit by a 15-W red light that provided 3 lx in both the open and enclosed arms. Each rat was used only once and was placed individually on the central platform facing an enclosed arm. The frequency of entry into either open or enclosed arms, as well as the time spent in each arm type, were recorded for

5 min (Pellow et al., 1985). Ethological parameters, such as unprotected head-dipping, number of entries into open arm's extremities, and protected stretch attend postures, were also recorded to increase the sensitivity of the test (Cole and Rodgers, 1994; Rodgers and Dalvi, 1997). The apparatus was cleaned with 10% ethanol solution between sessions.

5.3. Tissue preparation for acetylcholinesterase (AChE) assay

Rats were killed by decapitation 24 h or 1 month after treatment (immediately after the behavioral tests), and the hippocampus and prefrontal cerebral cortex were removed and homogenized 1:10 (w/w) in HEPES 20 mM, pH 7.4 buffer. Tissue homogenates were centrifuged at 3,000 g at 4°C for 5 min, and the supernatant was used for the determination of AChE activity. Brain AChE activity measurement was based on the Ellman Method (Ellman et al., 1961), and acetylthiocholine iodide was used as substrate. Samples were taken from different animals and evaluated in duplicate. The hydrolysis rate of acetylthiocholine iodide was measured at 412 nm through the release of the thiol compound, which produces the color-forming compound TNB when reacted with DTNB. The protein content was quantified by the method of Lowry (1951), and bovine serum albumin was used as the standard.

5.4. Surgical and electroencephalographic (EEG) recording procedures

The electroencephalogram (EEG) was recorded using a polygraph digital system (BIOPAC System, MP-100/WSW, Inc.). Signals were amplified 20,000 \times and filtered through a built-in 60-Hz notch filter, digitized at a sampling rate of 256 Hz, and recorded using the acquisition software ACQ Knowledge[®] version 3.2. Digital video recordings were made with a webcam (Orbit Logitech Quickcam[®]) located inside the Faraday cage, and the animals' behavior was simultaneously recorded (for detailed information on surgery and procedures, see Duarte et al. (2008)).

5.5. Drugs and injections

Pilocarpine hydrochloride (a non-selective muscarinic receptor agonist; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, 150 mg/kg) was injected intraperitoneally (i.p.), whereas methylscopolamine bromide (a muscarinic receptor antagonist; REI, USA, 1 mg/kg) was given subcutaneously (s.c.). Furthermore, pentylentetrazole hydrochloride (PTZ, a GABA-A receptor antagonist; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, 15 mg/kg, i.p.), diazepam (DZP, a GABA-A/BDZ receptor complex agonist; Dienpax[®], Sanofi-Winthrop Lab., São Paulo, SP, Brazil, 1 mg/kg, i.p.), and saline (NaCl 0.9%, i.p.) were also used in the experiments. All drugs were freshly dissolved in saline, which was used as control solution as well, in a volume injection of 1 ml/kg, and doses were taken from previous studies (Cavalli et al., 2009; Duarte et al., 2010; 2013; Duzzioni et al., 2008; Pellow and File, 1987).

5.6. Experimental procedures

All animals used in this study were treated with methylscopolamine (1 mg/kg, s.c.) 30 min prior to the injection of PLO or saline in order to prevent peripheral cholinergic effects. In Experiment 1, rats ($n=8$ per group) were injected with saline or PLO, and 24 h or 1 month later they were injected with saline, DZP or PTZ, followed 30 min later by the behavioral evaluation in the EPM test (see Figs. 1 and 2A for detailed information). In Experiment 2, *ex vivo* biochemical assays were performed with brain tissues from prefrontal cortex and hippocampus ($n=8$) extracted immediately after the behavioral tests (Experiment 1). In Experiment 3, animals were divided in 12 groups ($n=3-4$ per group) to carry out EEG recordings: Groups 1-6, rats receiving saline and re-injected with saline, DZP or PTZ 24 h or 1 month later; and Groups 7-12, rats receiving PLO and re-injected with saline, DZP or PTZ 24 h or 1 month later.

5.7. Data analysis

Data from EPM tests, biochemical assays and EEG quantitative analysis are expressed as mean \pm S.E.M. and evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a post-hoc Student Newman-Keuls' test for multiple comparisons, with "pretreatment" (saline or PLO) and "treatment" (saline, DZP or PTZ) as independent variables. A time-frequency spectral analysis using wavelet transformations was performed on the EEG traces to evaluate the effects of treatments in rats recorded 24 h or 1 month after the injections of PLO or saline. Frequencies between 3 and 40 Hz were analyzed in 10-s free-seizure epochs (30 samples selected during quiet behavior from 1-h recordings). In these epochs, the value of the most prominent frequencies was calculated (F1; the frequency with the highest power (in square microvolts per Hz) present at least 30% in the selected epoch). Wavelet analysis was conducted in EEG signals exported from ACQ-Knowledge[®] software to a Matlab[®] (v. 6.5 R13 Mathworks, Inc, MA, USA) routine (Romcy-Ferreira et al., 2008; Rossetti et al., 2012). Differences were considered to be significant when $p \leq 0.05$. All statistical analysis were performed using the software Statistica[®] 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), and the graphics were drawn with the GraphPad Prism version 4.0[®] software.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, which provided a research grant to Dr. TCM de Lima and the National Institute of Translational Neuroscience (INNT). CAPES and CNPq provided Ph.D. scholarships to AA Hoeller, M Duzzioni, FS Duarte, AFR Costa, ECS Santos and AA dos Santos.

REFERENCES

Acqua, E., Wilson, C., Fibiger, H.C., 1996. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and

Please cite this article as: Hoeller, A.A., et al., GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. Brain Research (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.045>

- hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J. Neurosci.* 16, 3089-3096.
- Adamec, R.E., Morgan, H.D., 1990. Amygdala kindling and anxiety in the rat. *Neuroreport* 1, 255-258.
- Adamec, R.E., Morgan, H.D., 1994. The effect of kindling of different nuclei in the left and right amygdala on anxiety in the rat. *Physiol. Behav.* 55, 1-12.
- Adhikari, A., Topiwala, M.A., Gordon, J.A., 2010. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron* 65, 257-269.
- Adhikari, A., Topiwala, M.A., Gordon, J.A., 2011. Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron* 71, 898-910.
- Appleyard, M.E., Taylor, S.C., Little, H.J., 1990. Acetylcholinesterase activity in regions of mouse brain following acute and chronic treatment with a benzodiazepine inverse agonist. *Br. J. Pharmacol.* 101, 599-604.
- Buzsáki, G., Leung, L.W., Vanderwolf, C.H., 1983. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* 287, 139-171.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193-1205.
- Cavalli, J., Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P., 2009. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 512-518.
- Charney, D.S., 2003. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* 38-50.
- Christmas, D., Hood, S., Nutt, D., 2008. Potential novel anxiolytic drugs. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3534-3546.
- Cole, J.C., Rodgers, R.J., 1994. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 114, 288-299.
- Cornwell, B.R., Arkin, N., Overstreet, C., Carver, F.W., Grillon, C., 2012. Distinct contributions of human hippocampal theta to spatial cognition and anxiety. *Hippocampus*.
- Cruz, A.P., Frei, F., Graeff, F.G., 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 171-176.
- Degroot, A., Treit, D., 2003. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience* 117, 493-501.
- Dori, A., Oriol, S., Livneh, U., Duek, O., Lin, T., Kofman, O., 2011. Acetylcholinesterase inhibitor pretreatment alters stress-induced expression of acetylcholinesterase transcripts in the mouse brain. *Neuroscience* 183, 90-98.
- Duarte, F.S., Marder, M., Hoeller, A.A., Duzioni, M., Mendes, B.G., Pizzolatti, M.G., De Lima, T.C., 2008. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology (Berl)* 197, 351-360.
- Duarte, F.S., Gavioli, E.C., Duzioni, M., Hoeller, A.A., Canteras, N.S., De Lima, T.C., 2010. 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.
- Duarte, F.S., Duzioni, M., Hoeller, A.A., Silva, N.M., Ern, A.L., Piermartiri, T.C., Tascia, C.J., Gavioli, E.C., Lemos, T., Carobrez, A.P., De Lima, T.C., 2013. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? *Psychopharmacology (Berlin)*.
- Duzioni, M., Calisto, A.V., Duarte, F.S., De Lima, T.C., 2008. Modulation of anxiety in rats evaluated in the elevated T-maze: evidence of the relationship between substance P and diazepam. *Behav. Brain Res.* 187, 140-145.
- Elman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Farach, F.J., Pruitt, L.D., Jun, J.J., Jerud, A.B., Zoellner, L.A., Roy-Byrne, P.P., 2012. Pharmacological treatment of anxiety disorders: current treatments and future directions. *J. Anxiety Disord.* 26, 833-843.
- File, S.E., Lister, R.G., 1984. Do the reductions in social-interaction produced by picrotoxin and pentylentetrazole indicate anxiogenic actions. *Neuropharmacology* 23, 793-796.
- File, S.E., Gonzalez, L.E., Andrews, N., 1998. Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic receptors. *Behav. Neurosci.* 112, 352-359.
- Friedman, A., Behrens, C.J., Heinemann, U., 2007. Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48 (Suppl. 5), 126-130.
- Garrido Sanabria, E.R., Castañeda, M.T., Banales, C., Perez-Cordova, M.G., Hernandez, S., Colom, L.V., 2006. Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience* 142, 871-883.
- Graef, S., Schonknecht, P., Sabri, O., Hegerl, U., 2011. Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology (Berlin)* 215, 205-229.
- Gray, J., McNaughton, N., 2000. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford University Press, Oxford.
- Gray, J.A., McNaughton, N., James, D.T., Kelly, P.H., 1975. Effect of minor tranquilisers on hippocampal theta rhythm mimicked by depletion of forebrain noradrenaline. *Nature* 258, 424-425.
- Gray, J.A., McNaughton, N., 1983. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 7, 119-188.
- Hajós, M., Hoffmann, W.E., Orbán, G., Kiss, T., Erdi, P., 2004. Modulation of septo-hippocampal Theta activity by GABA_A receptors: an experimental and computational approach. *Neuroscience* 126, 599-610.
- Jinks, A.L., McGregor, I.S., 1997. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res.* 772, 181-190.
- Jung, M.E., Lal, H., Gatch, M.B., 2002. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazolol as a model of anxiety: recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 429-439.
- Klimesch, W., 1999. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29, 169-195.
- Konopacki, J., Golebiewski, H., Eckenrodt, B., Waszczyk, M., Grabowski, R., 1997. Theta-like activity in hippocampal formation slices: the effect of strong disinhibition of GABA_A and GABA_B receptors. *Brain Res.* 775, 91-98.
- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C.A., Feldon, J., 2000. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav. Neurosci.* 114, 1119-1130.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Silveira, R., Morato, S., Walsh, T.J., 2000. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav. Brain Res.* 117, 97-105.
- Lesting, J., Geiger, M., Narayanan, R.T., Pape, H.C., Seidenbecher, T., 2011. Impaired extinction of fear and maintained amygdala-hippocampal theta synchrony in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52, 337-346.
- Leung, L.S., 1998. Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 275-290.
- Leung, L.S., Shen, B., 2007. GABA_B receptor blockade enhances theta and gamma rhythms in the hippocampus of behaving rats. *Hippocampus* 17, 281-291.

- 624 Little, H.J., 1991. The benzodiazepines: anxiolytic and withdrawal
625 effects. *Neuropeptides* 19, 11-14.
- 626 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein
627 measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*
628 193, 265-275.
- 629 McNaughton, N., Sedgwick, E.M., 1978. Reticular stimulation and
630 hippocampal theta rhythm in rats: effects of drugs.
631 *Neuroscience* 3, 629-632.
- 632 McNaughton, N., Gray, J.A., 2000. Anxiolytic action on the
633 behavioural inhibition system implies multiple types of
634 arousal contribute to anxiety. *J. Affect Disord.* 61, 161-176.
- 635 Mellanby, J., Gray, J.A., Quintero, S., Holt, L., McNaughton, N.,
636 1981. Septal driving of hippocampal theta rhythm: a role for
637 gamma-aminobutyrate in the effects of minor tranquilizers?
638 *Neuroscience* 6, 1412-1421.
- 639 Nutt, D.J., Glue, P., Lawson, C., Wilson, S., 1990. Flumazenil
640 provocation of panic attacks. Evidence for altered
641 benzodiazepine receptor sensitivity in panic disorder. *Arch.
642 Gen. Psychiatry* 47, 917-925.
- 643 Nutt, D.J., 2005. Overview of diagnosis and drug treatments of
644 anxiety disorders. *CNS Spectr.* 10, 49-56.
- 645 Pellow, S., 1985. Can drug effects on anxiety and convulsions be
646 separated? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 55-73.
- 647 Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open-
648 closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of
649 anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.
- 650 Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects
651 on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test
652 of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525-529.
- 653 Pellow, S., File, S.E., 1987. Can anti-panic drugs antagonise the
654 anxiety produced in the rat by drugs acting at the GABA-
655 benzodiazepine receptor complex? *Neuropsychobiology* 17,
656 60-65.
- 657 Pollack, M.H., Otto, M.W., Roy-Byrne, P.P., Coplan, J.D., Rothbaum,
658 B.O., Simon, N.M., Gorman, J.M., 2008. Novel treatment
659 approaches for refractory anxiety disorders. *Depress. Anxiety*
660 25, 467-476.
- 661 Quintero, S., Mellanby, J., Thompson, M.R., Nordeen, H., Nutt, D.,
662 McNaughton, N., Gray, J.A., 1985. Septal driving of
663 hippocampal theta rhythm: role of gamma-aminobutyrate-
664 benzodiazepine receptor complex in mediating effects of
665 anxiolytics. *Neuroscience* 16, 875-884.
- 666 Richter, M., Schilling, T., Müller, W., 1999. Muscarinic control of
667 intracellular connections to layer II in rat entorhinal cortex
668 slice. *Neurosci. Lett.* 273, 200-202.
- 669 Rodgers, R.J., Dalvi, A., 1997. Anxiety, defence and the elevated
670 plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 801-810.
- Romcy-Pereira, R.N., de Araujo, D.B., Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N.,
2008. A semi-automated algorithm for studying neuronal
oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and
coherence analysis. *J. Neurosci. Methods* 167, 384-392.
- Rossetti, F., Rodrigues, M.C., Marroni, S.S., Fernandes, A., Foresti,
M.L., Romcy-Pereira, R.N., de Araujo, D.B., Garcia-Cairasco, N.,
2012. Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation
of the nigro-tectal pathway in the Wistar audiogenic rat
(WAR) strain II: an EEG wavelet analysis and retrograde
neuronal tracer approach. *Epilepsy Behav.* 24, 391-398.
- Roy-Byrne, P., Wingerson, D.K., Radant, A., Greenblatt, D.J.,
Cowley, D.S., 1996. Reduced benzodiazepine sensitivity in
patients with panic disorder: comparison with patients with
obsessive-compulsive disorder and normal subjects. *Am. J.
Psychiatry* 153, 1444-1449.
- Sangha, S., Narayanan, R.T., Bergado-Acosta, J.R., Stork, O.,
Seidenbecher, T., Pape, H.C., 2009. Deficiency of the 65 kDa
isoform of glutamic acid decarboxylase impairs extinction of
cued but not contextual fear memory. *J. Neurosci.* 29,
15713-15720.
- Schetter, M.R., Porto, N.M., Moretto, M.B., Morsch, V.M., da
Rocha, J.B., Vieira, V., Moro, F., Neis, R.T., Bittencourt, S.,
Bonacorso, H.G., Zanatta, N., 2000. New benzodiazepines alter
acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochem. Res.*
25, 949-955.
- Sklan, E.H., Loewenthal, A., Korner, M., Ritov, Y., Landau, D.M.,
Rahlinen, T., Bouchard, C., Leon, A.S., Rice, T., Rao, D.C.,
Wilmore, J.H., Skinner, J.S., Soreq, H., 2004.
Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression
predict anxiety scores in Health, Risk Factors, Exercise
Training, and Genetics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101,
5512-5517.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase—new roles for
an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294-302.
- Vertes, R.P., 2005. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-
term memory. *Hippocampus* 15, 923-935.
- Wall, P.M., Finn, J., Messier, C., 2001. Infralimbic muscarinic M1
receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous
working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 155,
58-68.
- Woods, S.W., Charney, D.S., Silver, J.M., Krystal, J.H., Heninger, G.
R., 1991. Behavioral, biochemical, and cardiovascular
responses to the benzodiazepine receptor antagonist
flumazenil in panic disorder. *Psychiatry Res.* 36, 115-127.
- Zimmerman, G., Soreq, H., 2006. Termination and beyond:
acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission.
Cell Tissue Res. 326, 655-669.

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

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00360

Título

Participação de mecanismos glutamatérgicos e colinérgicos do hipocampo de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina e sua influência sobre a ansiedade e memória

Data de Entrada

02/06/2009

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

07/08/2009

Considerações

Ofício nº 127/CEUA/PRPE/2009

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

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

Prezado(s) Professor(a),

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

- APROVADO, por 03 (três) anos, para a utilização de 576 (quinhentos e setenta e seis) ratos (*Rattus norvegicus*).

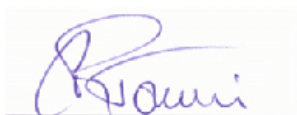
- Processo cadastrado sob o número: 23080.025621/2009-03

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 10/11/2012**

Data 10/08/2009

Parecer(es):

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

**ANEXO B – Autorização para a condução de experimentos
científicos em animais durante estágio sanduíche na *University of
Bristol***



No. PIL 30/9626

ANIMALS (SCIENTIFIC PROCEDURES) ACT 1986

PERSONAL LICENCE

to

carry out regulated procedures on living animals.

In pursuance of the powers vested in him by the above Act, the
Secretary of State hereby licenses

Mr A A Hoeller
School of Physiology & Pharmacology
c/o ASU - HOLT University of Bristol
Sch of Medical Sciences, University Walk
BRISTOL
BS8 1TD

to apply the techniques specified in column a of paragraph 15 of the attached Schedule to the kinds of animals in column b of the same paragraph at the place or places specified in paragraph 14 of this Schedule, subject to the restrictions and provisions contained in the Act, and subject also to the limitations and conditions contained in this licence and to such other conditions as the Secretary of State may from time to time prescribe.

This licence shall be in force until revoked by the Secretary of State and shall be periodically reviewed by him.

Home Office
2 Marsham Street
London SW1P 4DF

For the Secretary
of State



10 October 2011

NB. This licence does not authorise the licensee to perform any of the procedures specified in it unless they are carried out in the course of a project for which there is a project licence in force under the Act.

