

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

GABRIELA PANDINI SILOTE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA CETAMINA EM
RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM T ELEVADO:
POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
DE BDNF/TrkB NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL**

VITÓRIA

2016

GABRIELA PANDINI SILOTE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA CETAMINA EM
RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM T ELEVADO:
POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO
DE BDNF/TrkB NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Vanessa Beijamini Harres.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sâmia Regiane Lourenço Joca

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S585e Silote, Gabriela Pandini, 1989 -
Efeitos comportamentais da cetamina em ratos expostos ao
labirinto em T elevado: Possível envolvimento da via de sinalização de
BDNF/TrkB na matéria cinzenta periaquedutal / Gabriela Pandini Silote
– 2016.
95 f. : il.

Orientador: Vanessa Beijamini Harres.
Coorientador: Sâmia Regiane Lourenço Joca.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cetamina. 2. Labirinto. 3. Substância Cinzenta Periaquedutal. 4.
Receptores NMDA. 5. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo. I.
Harres, Vanessa Beijamini. II. Joca, Sâmia Regiane Lourenço. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 61

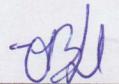
GABRIELA PANDINI SILOTE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA CETAMINA EM RATOS EXPOSTOS AO
LABIRINTO EM T ELEVADO: POSSIVEL ENVOLVIMENTO DA VIA DE
SINALIZAÇÃO DE BDNF/TrkB NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
(MCP)**

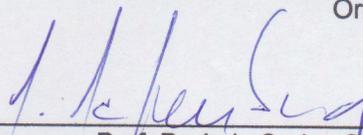
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 06 de Abril de 2016.

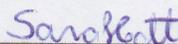
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr.ª Vanessa Beijamini Harres
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES
Orientadora



Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES



Dr.ª Sara Cristina Hott
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas- UFES

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª. Vanessa Beijamini Harres, pela excelente orientação nesse trabalho, pela dedicação, competência, apoio, paciência e por contribuir para o meu crescimento científico, pessoal e profissional, e pela amizade.

Aos integrantes que compuseram a banca de avaliação desse trabalho, Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg e a Drª. Sara Cristina Hott, pelas suas importantes contribuições.

À Profª. Drª Samia Regiane L. Joca, pelo apoio financeiro para execução das análises bioquímicas desse trabalho e por ter aberto as portas do seu laboratório.

À Doutoranda Deidiane Elisa Ribeiro, pelo auxílio técnico na execução das análises bioquímicas desse trabalho, por me acolher nesses períodos, por tornar agradável cada momento de trabalho, pelas conversas e conselhos e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia (PPGBF) pelo financiamento das idas à Ribeirão Preto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) pelo apoio técnico.

A todos os professores do PPGBF, pela sua contribuição para minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Camila, Ian e Luana, pelo carinho e colaboração na realização desse trabalho.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, Kelly, pela prontidão e eficiência no atendimento das partes burocráticas, pelo apoio e conversas.

À Sabrina, por me ajudar na execução desse trabalho, por tornar agradável o trabalho, pelas conversas dentro e fora do laboratório, pelos conselhos e pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório e aos agregados do laboratório, Mayara, Maria Paula, Vinicius, Letícia, Alciene, Tamires e Eduardo, pelos ensinamentos, pelas conversas e pela agradável convivência. Em especial, à Mayara e ao Vinicius, pelo auxílio em algumas etapas de execução desse trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação, pela amizade.

À Mayara pelo carinho, apoio e amizade, que mesmo longe durante esse período não deixou de participar desse momento.

À Maria Paula pelas agradáveis conversas dentro e fora do laboratório, pelo carinho e pela amizade.

Ao meu namorado, Fábio, minha gratidão, por todo amor, ajuda, dedicação, carinho, paciência, amizade e compreensão nessa trajetória. Por estar sempre ao meu lado me apoiando incondicionalmente, e por tornar a minha vida cada dia mais feliz.

À minha família, pelo apoio em todas as escolhas e em todos os momentos dessa trajetória, pela confiança e pelo amor incondicional que me fortalece todos os dias e por estarem presentes na minha vida.

Aos meus familiares pela compreensão, amor e apoio.

A todos os que participaram de forma direta e indireta contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

A cetamina é um antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Estudos pré-clínicos e clínicos têm sugerido que ela apresenta efeito antidepressivo de início rápido e relativamente persistente. O mecanismo de ação envolvido nesse efeito parece ser mais complexo do que o simples bloqueio dos receptores NMDA, envolve a ativação dos receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionico (AMPA) e da via de sinalização do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do receptor de tirosina cinase B (TrkB). Diversos fármacos antidepressivos são eficazes no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e no transtorno do pânico (TP) somente após tratamento crônico, é possível que a cetamina apresente efeito ansiolítico ou panicolítico de forma rápida e persistente. O labirinto em T elevado (LTE) é um modelo que permite avaliar, no mesmo procedimento, dois tipos de ansiedade: a ansiedade aprendida (esquiva inibitória), relacionada com o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), e a ansiedade inata (fuga), relacionada com Transtorno de Pânico (TP). O objetivo do estudo foi investigar os efeitos comportamentais induzidos pela cetamina em ratos expostos ao LTE e o possível envolvimento da via BDNF/TrkB na MCP (matéria cinzenta periaquedutal) nesses efeitos. Os resultados mostraram que a cetamina de 10 e 30 mg/Kg (doses subanestésicas) administrada de forma aguda não alteraram o comportamento dos ratos no LTE. Já a dose anestésica (80 mg/Kg), prejudicou a fuga 1, o que pode sugerir efeito tipo-panicolítico rápido. Quando a cetamina 10 mg/Kg foi administrada 24 horas antes do teste no LTE, houve facilitação da Fuga 1, o que pode sugerir um efeito tipo-panicogênico tardio. Já a dose anestésica da cetamina administrada 24 horas antes do teste facilitou à esquiva, o que sugere um efeito tipo-ansio gênico tardio, e ao mesmo tempo prejudicou a fuga 1, sugerindo um efeito tipo-panicolítico persistente. E o 5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)ciclo-heten-5,10-imina ; 0,05mg/Kg (MK-801; 0,05 mg/Kg) 24 horas antes do teste não alterou o comportamento dos animais. Quando a cetamina foi administrada diretamente na MCPD (matéria cinzenta periaquedutal dorsal) observou-se que apenas a dose mais baixa, de 2 μ g, facilitou a fuga 1, o que

caracteriza um efeito tipo-panicogênico rápido. Além disso, nenhum dos esquemas de administração e doses empregados alteraram a atividade locomotora dos animais no campo aberto. Para investigar o envolvimento da via de sinalização de BDNF/TrkB nos efeitos da cetamina e do MK-801 na ansiedade no LTE, foi realizada a quantificação de TrkB total e fosforilado nos resíduos 706/707 e 515 de tirosina (Y-706/707 e Y-515) da MCP de ratos. A cetamina 80mg/Kg e o MK-801 0,05 mg/Kg administrados agudamente antes da coleta da MCP, não induziram alteração estatisticamente significativa na quantidade de pTrkB nos resíduos Y-706/707 e Y-515. Adicionalmente, a cetamina 10 e 80 mg/Kg, administrada aproximadamente 24 horas antes da coleta da MCP, não induziu alteração estatisticamente significativa na quantidade de pTrkB no resíduo Y-706/707 e Y-515. Em conclusão, os resultados encontrados mostraram que a cetamina pode ter um efeito muito discreto no pânico, sendo que esse efeito depende tanto da dose quanto do esquema de administração. Ainda, pelo menos o efeito panicogênico da cetamina parece envolver a MCPD.

Palavras-Chave: Cetamina, LTE, MCPD, MK-801, Via de sinalização BDNF-TrkB.

ABSTRACT

Ketamine is a non-competitive antagonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. Preclinical and clinical studies have suggested that ketamine has a rapid and relatively sustained antidepressant effect. The mechanism of action involved in this effect appears to be more complex than simply blocking NMDA receptors, involving the activation of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors and brain derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway and its receptor, tropomyosin-related kinase B (TrkB). Several antidepressants are effective in treating generalized anxiety disorder (GAD) and panic disorder (PD) only after chronic treatment, it is possible that ketamine may also exhibit a rapid and sustained anxiolytic or panicolytic effect. The elevated T maze (ETM) is an animal model for assessing in the same procedure, two types of anxiety: learned anxiety (inhibitory avoidance), related to the GAD, and innate anxiety (escape) related to PD. The aim of the study was to investigate the behavioral effects induced by ketamine in rats exposed to ETM, and the possible involvement of BDNF/TrkB signaling pathway in PAG on these effects. The results showed that ketamine (10 and 30 mg/kg) administered acutely did not change the behavior of rats on ETM. The anesthetic dose (80 mg/Kg), impaired the escape 1, which may suggest rapid panicolytic-like effect. When the ketamine 10mg/kg was administered 24 hours before the ETM, facilitated escape 1, which may suggest delayed panicogenic-like effect. The anesthetic dose of ketamine given 24 hours before test, facilitated avoidance, which suggests a late anxiogenic-like effect, at the same time, impaired escape 1, that suggest a sustained panicolytic-like effect. MK-801 (0.05 mg/kg) 24 hours before the test did not change the behavior of the animals. When ketamine was administered directly into DPAG (dorsal periaqueductal grey matter) was observed that only the lowest dose (2 μ g) facilitated escape 1, which features a rapid panicogenic-like effect. Moreover, none of the administration schedules and doses used altered animals' locomotor activity on the open field test. To investigate the involvement of the BDNF/TrkB signaling pathway in the effects of ketamine and MK-801 on anxiety on the ETM, tests were performed to quantify total TrkB and phosphorylated in

the tyrosine 706/707 and 515 residues in rats' PAG. Ketamine 80mg/kg and MK-801 0.05mg/kg administered acutely previously to collecting/heaping the PAG did not induce statistically significant change in the amount of pTrkB residues Y-706/707 and Y-515. The results showed that the ketamine 10 and 80 mg/kg, administered approximately 24 hours before to collecting/heaping of PAG, did not induce statistically significant change in the quantity of pTrkB Y-706/707 and Y-515 residue. In conclusion, the results show that ketamine may have a slight effect in panic, but this effect depends on both the dose and the administration schedule. Even, at least the panicogenic effect of ketamine appears to involve the MCPD.

Keywords: Ketamine, ETM, DPAG, MK-801, BDNF-TrkB signaling pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da neurotransmissão glutamatérgica.....	19
Figura 2. Vias de sinalização envolvidas na ativação de TrkB pelo BDNF.....	23
Figura 3. Ilustração esquemática do possível mecanismo de ação do efeito tipo-antidepressivo da cetamina.....	26
Figura 4. Ilustração esquemática do LTE.....	40
Figura 5. Ilustração Esquemática do aparato do campo aberto.....	41
Figura 6. Representação do esquema de diluição seriada da solução padrão de BSA 1µg/1µL na microplaca de ELISA.....	44
Figura 7. Figura esquemática do método do Western Blot.....	47
Figura 8. Resultados para a Cetamina 10 e 30 mg/Kg agudo de ratos testados no LTE.....	54
Figura 9. Resultados para a Cetamina 80 mg/Kg agudo de ratos testados no LTE.....	56
Figura 10. Resultados para a Cetamina 10 e 30 mg/Kg 24 horas de ratos testados no LTE.....	58
Figura 11. Resultados para a Cetamina 80 mg/Kg 24 horas de ratos testados no LTE.....	60
Figura 12. Resultados para o MK-801 0,05 mg/Kg 24 horas de ratos testados no LTE.....	62
Figura 13. Fotomicrografia do sítio de injeção na MCPD.....	63
Figura 14. Representação do local dos sítios de injeção na MCPD.....	64
Figura 15. Resultados para cetamina, intra-MCPD, de ratos testados no LTE.....	66
Figura 16. Resultados da cetamina 80 mg/Kg agudo na quantidade de pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515 na MCP.....	68
Figura 17. Resultados do MK-801 0,05 mg/Kg agudo na quantidade de pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515 na MCP.....	69
Figura 18. Resultados da cetamina 10 mg/Kg, 24 horas, na quantidade de pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515 na MCP.....	70
Figura 19. Resultados da cetamina 80 mg/Kg, 24 horas, na quantidade de pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515 na MCP.....	71

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Resultados de estudos pré-clínicos de doses da Cetamina em diferentes modelos experimentais de ansiedade.....	31
Tabela 2. Efeito da cetamina 10 e 30 mg/Kg agudo na atividade locomotora.....	55
Tabela 3. Efeito da cetamina 80 mg/Kg agudo na atividade locomotora.....	57
Tabela 4. Efeito da cetamina 10 e 30 mg/Kg aproximadamente 24 horas na atividade locomotora.....	59
Tabela 5. Efeito da cetamina 80 mg/Kg aproximadamente 24 horas na atividade locomotora.....	61
Tabela 6. Efeito do MK-801 0,05 mg/Kg aproximadamente 24 horas na atividade locomotora.....	63
Tabela 7. Efeitos da cetamina 2 e 20 µg/0,2 µL intra-MCPD na atividade locomotora.....	67

LISTA DE SIGLAS

4E-BP1- fator eu cariótico 4E de ligação de proteína 1
ABL- amígdala basolateral
Akt- fosfocinase de serina/treonina
AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico
AMPc- adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de Variância
AP- coordenada antero-posterior
AP7- ácido 2-amino-7 fosfonoheptanóico
BA – braço aberto
BDNF- fator neurotrófico derivado do cérebro
BF – braço fechado
BSA - padrão de albumina bovina
CAMKII- cinase dependente de cálcio-calmodulina
Carboxi-PTIO -(2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido
CCVD – canal de cálcio voltagem-dependente
CEUA- comissão de ética no uso de animais
CPF – córtex pré-frontal
CREB – elemento de ligação de resposta ao amp cíclico
DAG- diacilglicerol
DEA/NO- dietilamina de óxido nítrico
DPAG – dorsal periaqueductal gray matter
DSM-V – Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais
DV – coordenada dorso-ventral
EAAT – transportador de aminoácidos excitatórios
ELISA – ensaio imunoenzimático
ENV- estimulação do nervo
epm – erro Padrão da Média
ERK- fosfocinase regulada por sinal extracelular
EUA – Estados Unidos da América
ETM – elevated t maze
GAPDH – gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase.
Gab 1 – Grb-associated binder 1
GRB2- proteína de ligação ao receptor nuclear do fator de crescimento 2
GDP - guanosina Difosfato
Gln- glutamina
Glu- glutamato
GluR1- subunidade de receptor AMPA
i.m. - intramuscular
i.p. – intraperitoneal

IP₃ – inositol-1,4,5- trifosfato
irs1, irs2 – substrato do Receptor de Insulina-1 e -2
L-NAME - metil éster de L-NG-nitroarginina
LCE – labirinto em cruz elevado
LTE – labirinto em t elevado
ltp – potenciação de longo prazo
MAPK – fosfocinase ativada por mitógeno
MCP – matéria cinzenta periaquedutal
MCPD- matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPDL – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPDM - matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial
Met - metionina
mGlu- receptor glutamatérgico metabotrópico
MK-801 – 5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)ciclo-heten-5,10-imina (Doxizipina)
ML – coordenada médio-lateral
m-TOR- alvo mamífero da Rapamicina
NBQX – 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfoamoiibenzo(f)-quinozalino
NGF- fator de crescimento do nervo
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS – sintase do óxido nítrico
NR1- subunidade do receptor nmda
NR2A a D- subunidade do receptor nmda
NR3A e B- subunidade do receptor nmDA
PAG – periaqueductal gray matter
p70S6K- 70S6K fosforilado
PCC - proteína cinase c
PCP- fenciclidina
PE-10 – tubo de polietileno
PI3K – fosfocinase do fosfatidil inositol
PKC – cinase proteica C
PLC- fosfolipase C
PM- peso molecular
PSD-95- proteína de densidade pós-sináptica
PVDF- fluoreto de polivinilideno
pTrkB- receptor de tirosina cinase B fosforilado
Ras – proteína de ligação do GTP
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
s.c.- subcutâneo
SDS-PAGE - gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio

SH2 – homologia ao src tipo-2

Shc – proteína shc (com homologia a Src e semelhante a colágeno)

SIN-1 - cloreto de 3-morfolinosilnomina

SNARE – proteínas de adesão sensíveis à N-etilmaleimida

SNC – sistema nervoso central

SNP – polimorfismo de um único nucleotídeo

sos – fator de troca de nucleotídeo de guanosina

TAG - transtorno de ansiedade generalizada

TNF- teste do nado forçado

TP- transtorno do pânico

TrkB – receptor de tirosina cinase B

Val - valina

vGluT – transportador vesicular de glutamato

WB - western blot

Y-515 – resíduo 515 de tirosina

Y-706/707 – resíduo 706/707 de tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	18
1.2. BDNF E O TrkB	21
1.3. CETAMINA	24
1.4. MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CETAMINA	25
1.5. BDNF, TrkB E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS	27
1.6. ANSIEDADE, GLUTAMATO E ANTAGONISTAS NMDA	29
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	34
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. ANIMAIS	36
3.2. DROGAS E REAGENTES	36
3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	37
3.4. INJEÇÃO DE DROGAS E HISTOLOGIA	38
3.5. TESTES COMPORTAMENTAIS	39
3.5.1. LTE	39
3.5.2. CAMPO ABERTO	41
3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TrkB TOTAL, pTrkB Y-705/706, pTrkB Y-515	42
3.6.1. COLETA DAS AMOSTRAS	42
3.6.2. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD	42
3.6.3. DETERMINAÇÃO DE TrkB E pTrkB NO RESÍDUO Y-515 E Y-705/706 POR WESTERN BLOTTING	45
3.7. DESENHO EXPERIMENTAL	48
3.7.1. EXPERIMENTO 1	48
3.7.2. EXPERIMENTO 2	48
3.7.3. EXPERIMENTO 3	49
3.7.4. EXPERIMENTO 4	49
3.7.5. EXPERIMENTO 5	49
3.7.6. EXPERIMENTO 6	50
3.7.5. EXPERIMENTO 7	50
3.7.5. EXPERIMENTO 8	50
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4. RESULTADOS	52
4.1. EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS	53
4.2. QUANTIFICAÇÃO DE TrkB Total, pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515 NA MCP	67
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. ANEXOS	95
ANEXO A	96
ANEXO B	97

INTRODUÇÃO

1.1. NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O Glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2013). Diversos estudos demonstraram que esse neurotransmissor desempenha um papel importante na plasticidade, memória, comportamento, aprendizado e resiliência celular (para revisão ver COLLINGRIDGE; BLISS, 1995; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2012). Entretanto, a elevação patológica da concentração de glutamato extra-sináptico pode provocar dano ou morte neuronal, processo conhecido como excitotoxicidade (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2013). Sabe-se que as ações do glutamato ocorrem por meio da sua interação com duas famílias de receptores localizados pré- e pós-sinápticamente: os receptores ionotrópicos, que operam canais iônicos na membrana; e os receptores metabotrópicos, que estão acoplados a proteína G (KEW; KEMP, 2005; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009). A representação esquemática da neurotransmissão glutamatérgica pode ser observada na Figura 1.

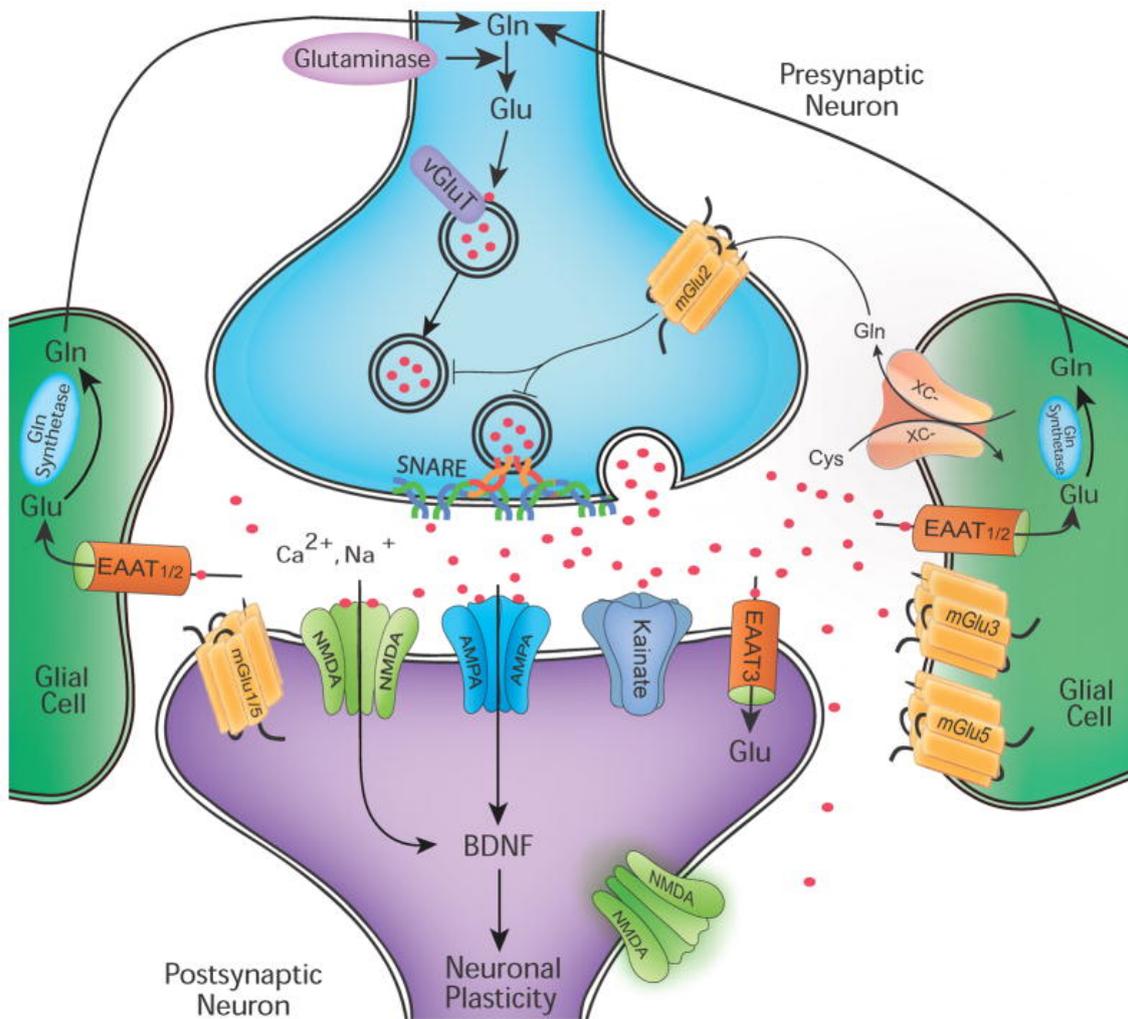


Figura 1. Ilustração da neurotransmissão glutamatérgica. Em azul, está representado o neurônio pré-sináptico, em roxo o neurônio pós-sináptico e em verde as células da glia. No neurônio pré-sináptico, a glutamina (Gln) pela glutaminase, é convertida em glutamato (Glu). O Glu é transportado para o interior da vesícula pré-sináptica através do Transportador Vesicular de Glutamato (vGluT). A despolarização do terminal pelo potencial de ação leva à fusão da membrana vesicular com a membrana pré-sináptica através das proteínas de adesão sensíveis a N-etilmaleimida (SNARE), liberando o Glu na fenda. O Glu liberado, pode agir em receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato), nos metabotrópicos (mGlu1/8) ou ser recaptado pelo transportador de aminoácidos excitatórios 3 (EAAT3) na membrana pós-sináptica, ou ser recaptado pelo EAAT_{1/2}, presente nas células da glia. Depois da recaptura, o Glu pela glutamina sintetase (Gln synthetase) é convertido em Gln, a qual é transportada para o neurônio pré-sináptico. (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2013).

Existem 8 tipos de receptores metabotrópicos (mGluR1 a 8) que são divididos em três grupos com base na homologia estrutural, no mecanismo de transdução de sinal e na farmacologia. O grupo I (mGluR1 e 5) está acoplado a proteína G_{q/11} excitatória. Sua ação se dá por meio da ativação da fosfolipase C

(PLC), liberando inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 mobiliza Ca^{2+} das reservas intracelulares e o DAG ativa a cinase proteica C (PKC). Os grupos II (mGluR2 e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8) estão acoplados à proteína $G_{i/o}$ inibitória, que inibe a adenilato ciclase, reduzindo a produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Uma das consequências dessa cascata é a abertura de canais de potássio retificadores e fechamento de canais de cálcio (Ca^{2+}), para desempenhar ação predominantemente inibitória, regulando outros importantes neurotransmissores (KEW; KEMP, 2005).

Dentre os receptores ionotrópicos, tem-se o N-metil-D-aspartato (NMDA), o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico (AMPA) e o cainato. Destes, o NMDA é formado por quatro subunidades com 3 domínios transmembrânicos e uma alça reentrante e os demais por 4 domínios transmembrânicos formando um canal iônico. Quando os receptores NMDA são ativados, permitem a passagem de Na^+ , K^+ , e Ca^{2+} , enquanto os receptores AMPA e cainato permitem a passagem de Na^+ e K^+ , que despolarizam a membrana e ativam uma cascata de sinalização (DU *et al.*, 2006; KEW; KEMP, 2005).

Foram identificadas subunidades do receptor NMDA, quais sejam, sendo elas NR1, NR2A-NR2D e NR3A e NR3B, que apresentam distribuição diferenciada no SNC (GOEBEL; POOSCH, 1999; KEW; KEMP, 2005). O sítio de ligação do glutamato está localizado nas subunidades NR2A e NR2B, sendo que ambas estão amplamente expressas em áreas implicadas com o sistema límbico no SNC, como por exemplo, o hipocampo, córtex pré-frontal medial, tálamo anterior, giro do cíngulo e córtex orbito-frontal (DU *et al.*, 2006; SANACORA *et al.*, 2008). A subunidade NR1 é o sítio de ligação um co-agonista do glutamato, a glicina ou D-serina (DU *et al.*, 2006; KLECKNER; DINGLEDINE, 1988; KURYATOV; LAUBE, 1994). A ativação dos receptores NMDA exige a ligação simultânea da glicina ou D-serina e do glutamato, nos seus respectivos sítios de ligação, que promovem a abertura de um canal que permite o influxo de Na^+ e Ca^{2+} bem como efluxo de K^+ bem como (KLECKNER; DINGLEDINE, 1988). Nos receptores NMDA, os íons Mg^{2+} bloqueiam o poro iônico da membrana em repouso. A despolarização da membrana em cerca de 20 mV libera o Mg^{2+} , permitindo a ação do Glu. A despolarização da membrana é produzida por

séries de potenciais pós-sinápticos excitatórios devido a liberação de outros mediadores ou à ativação de canais voltgem dependente em regiões adjacentes ao receptor NMDA (MAYER; WESTBROOK; GUTHRIE, 1984).

Em sinapses maduras, os receptores AMPA podem ser coexpressos com os NMDA, desse modo contribuindo para a plasticidade sináptica (BARRIA; MALINOW, 2002; LISSIN et al., 1998).

1.2. BDNF E O TrkB

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma proteína que foi primeiramente isolada do cérebro de porco (BARDE; EDGAR; THOENEN, 1982). Ela pertence à família das neurotrofinas e apresenta similaridades estrutural e funcional com o fator de crescimento do nervo (NGF; LEIBROCK et al., 1989). O BDNF está amplamente distribuído no SNCe, em particular no hipocampo e córtex cerebral de camundongos adultos (HOFER *et al.*, 1990). O BDNF tem uma função importante na regulação da sobrevivência, crescimento, diferenciação e manutenção dos neurônios e na plasticidade sináptica (para revisão ver PARK; POO, 2013).

A ação do BDNF ocorre através da ligação de alta afinidade ao receptor de tirosina cinase B (TrkB; KLEIN *et al.*, 1991), um receptor com atividade tirosina-cinásica. Quando ativados pela ligação ao BDNF, os receptores sofrem dimerização e autofosforilação de 7 resíduos intracelulares de tirosina dos segmentos citoplasmáticos, que servem de âncora para ligação de moléculas adaptadoras e efetoras (MINICHELLO, 2009). A autofosforilação no resíduo 705/706 de tirosina (Y705/706) é considerado um passo crítico para ativação do receptor e responsável por regular a fosforilação e ativação dos outros resíduos.

A fosforilação do resíduo Y-816 leva a ativação da via de PLC- γ (RANTAMÄKI et al., 2007), gerando o DAG e IP3. O IP3 promove a liberação de cálcio dos

reservatórios intracelulares, resultando na ativação de fosfocinases dependentes de cálcio-calmodulina, que, por sua vez, ativam a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB). O aumento de CREB induz a expressão gênica e alterações sinápticas de longo prazo (LTP; MINICHIELLO, 2009; RANTAMÄKI et al., 2007). Já o DAG ativa cinase proteica C (PKC), que está envolvida na sinaptogênese, dentre outras funções (para revisão ver, MINICHIELLO, 2009).

Por sua vez, o resíduo Y-515 fosforila proteínas adaptadoras de shc, e a proteína de ligação ao receptor nuclear do fator de crescimento 2 (GRB2) e/ou fator de troca de nucleotídeo de guanosina (SOS), levando a ativação da via Ras-fosfocinase ativada por mitógeno (MAPK). A via Ras-MAPK promove a diferenciação e crescimento neuronal. A via da fosfocinase do fosfatidil inositol (PI3K) requer proteínas adaptadoras como a GRB associado ao ligante-1 (GAB-1), substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) e 2 (IRS2). Uma vez ativada, a PI3K altera a composição dos fosfolípides de inositol da membrana, que ativa fosfocinase de serina/treonina (Akt) e, posteriormente, alvo em mamífero da rapamicina (mTOR), uma importante molécula reguladora da síntese de proteínas (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010; MINICHIELLO, 2009; YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2011). A Figura 3 mostra de forma esquemática a ativação do TrkB e das suas principais vias de sinalização.

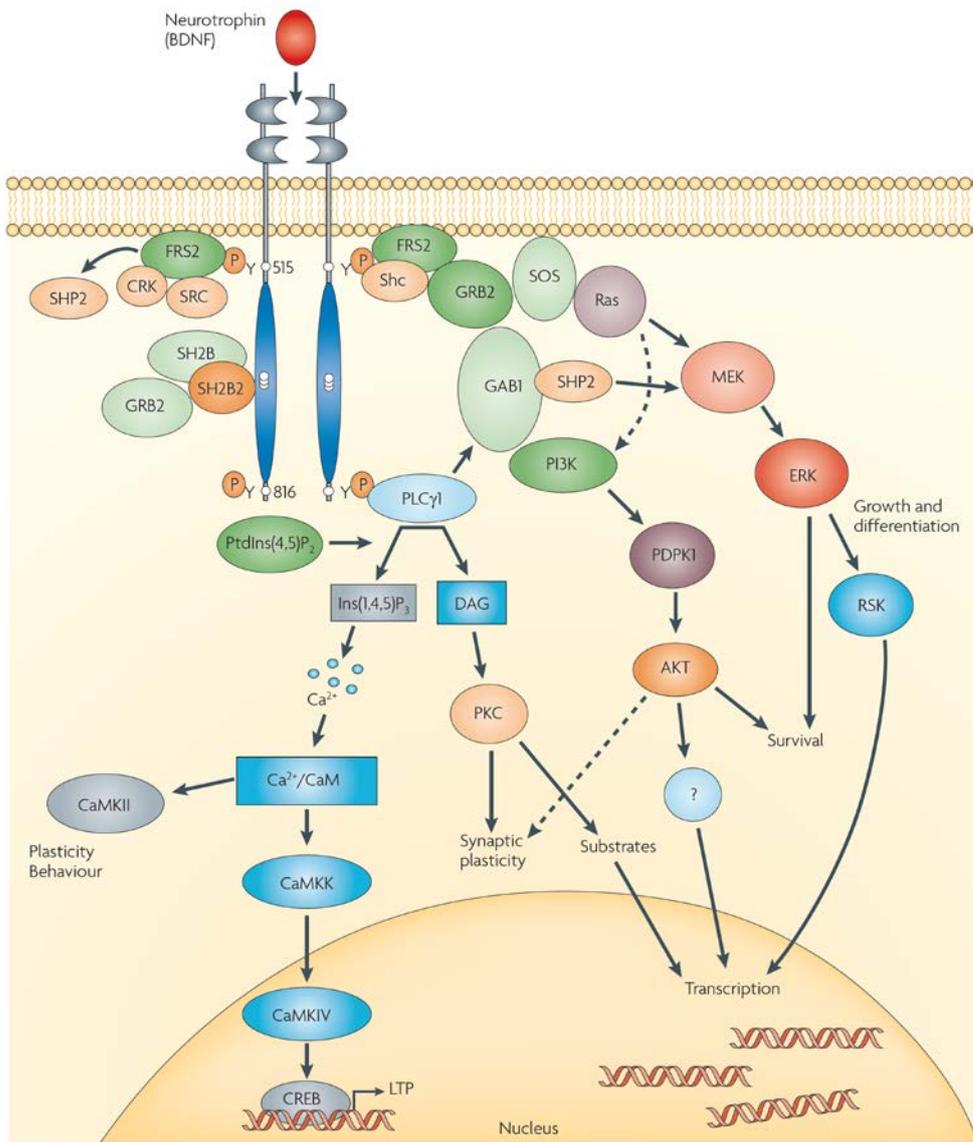


Figura 2. Vias de sinalização envolvidas na ativação do TrkB pelo BDNF. Quando o BDNF interage com o TrkB, ocorre a ativação do receptor, com dimerização e autofosforilação em resíduos intracelulares específicos de tirosina, como o resíduo Y-515 e o Y-816. A fosforilação do resíduo Y-515 recruta proteínas adaptadoras que ativam a via de sinalização de Ras-MAPK, que promove a diferenciação e crescimento neuronal. Já a ativação da via do PI3K, altera a composição dos fosfolípidos de inositol da membrana, o que ativa Akt, e posteriormente a mTOR, uma molécula reguladora da síntese de proteínas que é importante para a sobrevivência celular e crescimento neuronal. A fosforilação do Y-816 ativa a via de PLC e gera a DAG e IP3. O IP3 promove a liberação de cálcio das suas reservas, que ativa a CREB, que por sua vez induz a expressão gênica e a alterações sinápticas de longo prazo. O DAG ativa a PKC, que altera a plasticidade sináptica (MINICHELLO, 2009).

1.3. CETAMINA

A cetamina, um anestésico dissociativo, é um antagonista não competitivo de de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (KOHRS; DURIEUX, 1998; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; WHITE; WAY; TREVOR, 1982). Estudos clínicos sugerem que a cetamina produz resposta antidepressiva rápida e persistente em pacientes deprimidos (BARRIA; MALINOW, 2002; BERMAN *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2006). Por exemplo, pacientes tratados com cetamina intravenosa na forma de infusão apresentaram uma melhora rápida e robusta nos sintomas depressivos que se manteve por 72 horas, de acordo com avaliação feita a partir da Escala de Depressão de Hamilton (BERMAN *et al.*, 2000; DIAZGRANADOS *et al.*, 2010; ZARATE *et al.*, 2006). Clinicamente, o início rápido para o aparecimento do efeito antidepressivo é interessante, tendo em vista que a eficácia de todos os antidepressivos disponíveis no momento depende do tratamento crônico, aumentando a chance de abandono do tratamento (JICK; KAYE; JICK, 2004). Por outro lado, o uso clínico da cetamina é limitado pela sua potencial toxicidade e abuso (BERMAN *et al.*, 2000). Dentre os efeitos adversos, destacam-se os seus efeitos psicotomiméticos, de delírios, ilusões vívidas, estado dissociativo ou experiências extracorpóreas (sensação de flutuar fora do corpo) e alucinações (JANSEN, 2000; WHITE *et al.*, 1980).

Estudos pré-clínicos (GARCIA *et al.*, 2008; KOIKE; IIJIMA; CHAKI, 2011; LI *et al.*, 2011; MAENG *et al.*, 2008; YILMAZ *et al.*, 2002) indicam que a cetamina apresenta um efeito tipo-antidepressivo bastante singular, pois tem início rápido e relativamente persistente (MAXWELL *et al.*, 2006). A injeção de cetamina em dose única apresenta efeito tipo-antidepressivo em vários experimentais em animais, como por exemplo, no teste de estresse moderado crônico (AUTRY *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2016), no teste do nado forçado (AUTRY *et al.*, 2012; MAENG *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2016), no teste de suspensão pela cauda (KOIKE; IIJIMA; CHAKI, 2011) e no teste do desamparo aprendido (AUTRY *et al.*, 2012b; KOIKE; IIJIMA; CHAKI, 2011; MAENG *et al.*, 2008). Além disso, o efeito tipo-antidepressivo persiste por até 7 dias após a única injeção de cetamina (AUTRY *et al.*, 2012b; LI *et al.*, 2011). Vale ressaltar que os antidepressivos tradicionais somente induzem efeitos tipo-antidepressivos no teste de estresse moderado crônico ou no desamparo aprendido após

tratamentos crônicos (WILLNER, 2005). Dessa forma, a elucidação do mecanismo de ação subjacente aos seus efeitos facilitará o desenvolvimento de drogas mais eficazes e seguras.

Além da cetamina, outros antagonistas NMDA também parecem induzir efeito antidepressivo em modelos experimentais. Por exemplo, o 5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo(a,d)ciclo-hepten-5,10-imina (MK-801) também é um antagonista não competitivo de receptor NMDA (para revisão ver HARVEY; SHAHID, 2012), que produz uma redução no tempo de imobilidade no teste do nado forçado (GHASEMI; RAZA; DEHPOUR, 2010; MAJ, 1992; PANCONI *et al.*, 1993) e no teste de suspensão pela cauda em doses nas quais a atividade locomotora não foi afetada (PANCONI *et al.*, 1993).

1.4. MECANISMO DE AÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CETAMINA

O mecanismo de ação envolvido no efeito antidepressivo da cetamina parece ser mais complexo do que o simples bloqueio dos receptores NMDA. Por exemplo, o estudo de Moghadam e colaboradores (1997) mostrou que a administração sistêmica de cetamina nas doses subanestésicas leva a um aumento nos níveis extracelulares de glutamato no córtex pré-frontal (CPF) de ratos (MOGHADDAM *et al.*, 1997). Ainda, outro estudo mostrou que o antagonismo no receptor glutamatérgico do tipo NMDA bloqueia a atividade espontânea de interneurônios gabaérgicos, o que resultaria na desinibição da transmissão glutamatérgica (HOMAYOUN; MOGHADDAM, 2007). Esse estudo mostrou também que a administração de MK-801 reduz a atividade espontânea de interneurônios gabaérgicos no CPF de ratos conscientes, e aumenta na taxa de disparo de neurônios glutamatérgicos (HOMAYOUN; MOGHADDAM, 2007). Uma vez que a cetamina, assim como o MK-801, é um antagonista não competitivo do receptor NMDA, pode-se inferir que ela apresente a mesma ação. A Figura 2 esquematiza o mecanismo de ação da cetamina.

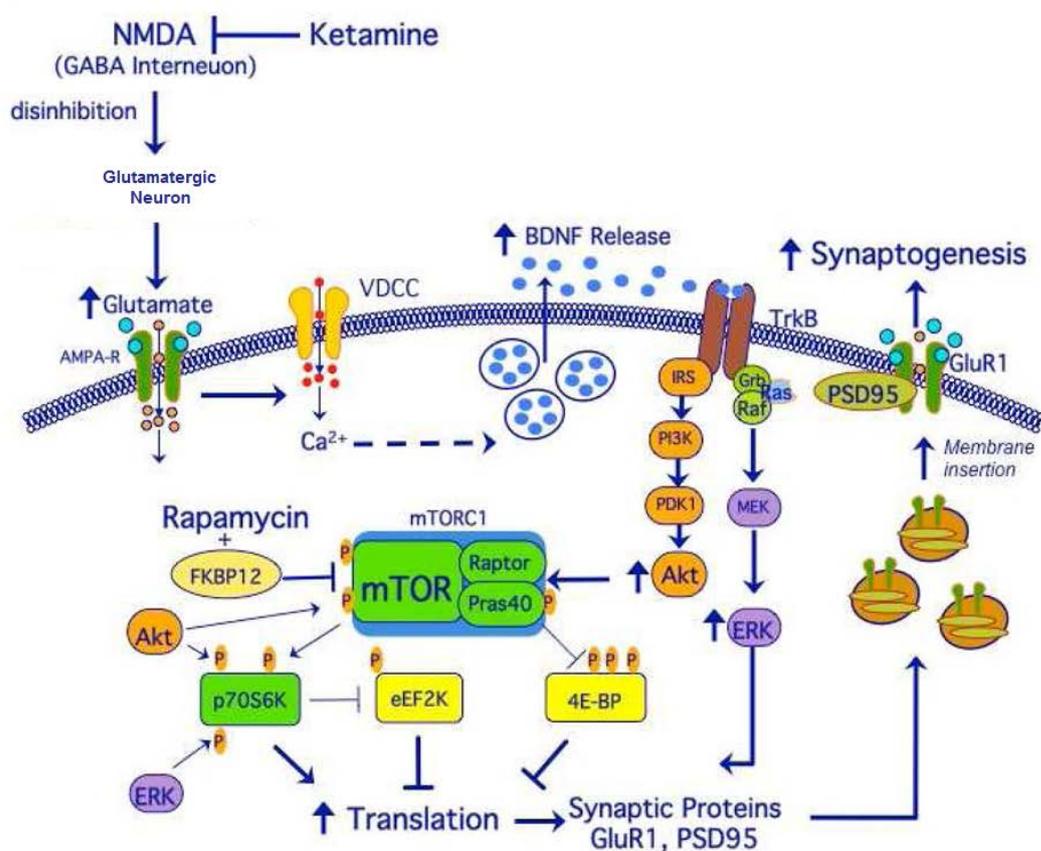


Figura 3. Ilustração esquemática do possível mecanismo de ação do efeito tipo-antidepressivo da cetamina. A cetamina em doses subanestésicas bloqueia os receptores NMDA localizados em interneurônios GABAérgicos e promove a inibição desses neurônios. A redução da atividade dos interneurônios GABAérgicos desinibe neurônios glutamatérgico e estimula a liberação de Glu. Uma vez liberado, o Glu ativa receptores AMPA pós-sinápticos. Essa ativação aumenta a liberação de BDNF, que age em TrkB, e facilita a ativação das vias de sinalização de Akt e ERK. Essas vias aumentam a sinalização de mTOR e terminam com a síntese de proteínas pós-sinápticas, como o GluR1 e PSD95, que induzem a sinaptogênese (Modificado de DUMAN et al., 2012).

O efeito tipo-antidepressivo da cetamina no teste do nado forçado (MAENG *et al.*, 2008), no desamparo aprendido e no teste da suspensão da cauda (KOIKE; IJIMA; CHAKI, 2011) foi atenuado pela administração prévia de 1,2,3,4-tetra-hidroxi-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]-quinoxalino-7-sulfonamida (NBQX), um antagonista dos receptores AMPA. Contudo, o NBQX não apresenta efeito algum no teste do nado forçado administrado isoladamente (MAENG *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem a participação dos receptores AMPA no efeito

antidepressivo agudo da cetamina. Por outro lado, a administração prévia de NBQX aboliu o efeito antidepressivo da cetamina, mas não da imipramina, no teste do nado forçado (MAENG *et al.*, 2008). Além disso, o BDNF é importante para ativação do mTOR. A ativação do receptor AMPA despolariza a membrana e ativa canal de cálcio voltagem-dependente (CCVD) do tipo-L, aumentando o influxo de Ca^{2+} e facilitando a liberação de BDNF na fenda sináptica (JOURDI *et al.*, 2009; LAUTERBORN *et al.*, 2000). Uma vez liberado, o BDNF age no seu receptor de TrkB (KLEIN *et al.*, 1991). Essa ação leva à ativação das vias de sinalização Akt e de fosfocinase regulada por sinal extracelular (ERK), que estimulam a mTOR, levando à síntese de proteínas sinápticas importantes para o efeito final da cetamina (CUNHA; BRAMBILLA; THOMAS, 2010).

Já os efeitos duradouros da cetamina parecem ser explicados pelo aumento da densidade de brotamento axonal no CPF através da ativação da cascata intracelular de sinalização mTOR induzidos por essa droga (LI *et al.*, 2011). A mTOR é uma fosfocinase de resíduos de serina e treonina que tem um papel central na regulação da expressão de proteínas envolvidas na formação de novas conexões sinápticas e na LTP (HOEFFER; KLANN, 2010). Os imipramina e a fluoxetina não ativam a via de sinalização mTOR (LI *et al.*, 2011). O bloqueio da via de mTOR suprime os efeitos comportamentais da cetamina em modelos de depressão (LI *et al.*, 2011). Ainda, a ativação dessa via de sinalização é dependente da ativação prévia do receptor AMPA, já que a administração prévia de NBQX bloqueia a ativação da via de mTOR no CPF (LI *et al.*, 2011).

1.5. BDNF, TrkB E TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Estudos mostram que os níveis de BDNF plasmáticos e em determinadas estruturas cerebrais, como o hipocampo, o estriado, o CPF, estão reduzidos em situações, relacionadas ao estresse (ROCERI *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 1995), depressão (CHEN *et al.*, 2001; KAREGE *et al.*, 2005b), e ansiedade

(AUTRY *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2007a). Adicionalmente estudos post mortem em pacientes deprimidos mostraram reduções de BDNF tanto no hipocampo quanto no CPF (DWIVEDI *et al.*, 2003; KAREGE *et al.*, 2005a). Também foi observado a redução dos receptores TrkB nas mesmas regiões (DWIVEDI *et al.*, 2003). Os níveis de BDNF também estão reduzidos no soro de paciente deprimidos (KAREGE *et al.*, 2005b). É importante ressaltar que essa redução pode ser revertida pelo tratamento crônico antidepressivos (CHEN *et al.*, 2001; KAREGE *et al.*, 2005a) e com eletroconvulsoterapia (NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995). Situações de estresse, como o isolamento social por 6 horas (BARRIENTOS *et al.*, 2003) e a imobilização por 1 ou 2 horas (SMITH *et al.*, 1995) também reduziram os níveis de BDNF no hipocampo de ratos.

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) no gene de BDNF, com substituição de uma metionina (Met) por uma valina (Val) no códon 66 do gene (Val66Met), reduz a liberação de BDNF (CHEN *et al.*, 2006; HASHIMOTO, 2012), foi associado com o aumento de ansiedade em camundongos. Em outro estudo, o nocaute do gene de BDNF aumentou a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (LCE; MACQUEEN *et al.*, 2001). No mesmo sentido, pacientes portadores da homozigose Met66Met apresentaram escores mais elevados para ansiedade antecipatória e medo da incerteza do que os portadores do genótipo Val66Met e Val66Val (MONTAG *et al.*, 2010).

Entretanto, camundongos com aumento na expressão de BDNF na amígdala basolateral (ABL) apresentaram aumento da ansiedade no LCE e também aumento na densidade da espinha dendrítica dessa região, (GOVINDARAJAN *et al.*, 2006). A injeção intra-hipocampo dorsal de BDNF produziu efeito tipo-ansiógênico em ratos submetidos ao labirinto em T elevado (LTE) e ao teste de transição claro/escuro (CASAROTTO; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2012)

O TrkB, o receptor de BDNF, também parece desempenhar um importante papel na ansiedade. Por exemplo, em humanos, a deleção de 11 pares de bases na região promotora do gene para o TrkB está relacionado com o aumento na ansiedade (ERNST *et al.*, 2011). Em estudos com animais, uma deleção do TrkB nas células progenitoras adultas do hipocampo aumenta a

ansiedade em camundongos (BERGAMI *et al.*, 2008), assim como camundongos nocaute para TrkB apresentam aumento na ansiedade no labirinto em zero elevado (ZORNER *et al.*, 2003).

No pânico, CASAROTTO *et al.* (2010) mostraram que a injeção de BDNF diretamente na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), uma estrutura fundamental nos ataques de pânico (SCHENBERG *et al.*, 2001), induziu efeito tipo-panicolítico em ratos (CASAROTTO *et al.*, 2010). Outro estudo do mesmo grupo mostrou que o efeito tipo-panicolítico do tratamento crônico (durante 21 dias) com diferentes antidepressivos foi acompanhado do aumento da quantidade de BDNF e na MCPD e no hipocampo (CASAROTTO *et al.*, 2015). Por outro lado, o tratamento crônico com ansiolíticos, como a buspirona, o diazepam e clonazepam, deixaram inalterado o nível dessa neurotrofina nas mesmas estruturas cerebrais. Ainda, o tratamento crônico com fluoxetina e imipramina aumentou a ativação do TrkB na MCPD (CASAROTTO *et al.*, 2015). Diante das evidências apresentadas, é possível que o BDNF e o seu receptor, o TrkB estejam envolvidos com o possível efeito da cetamina na ansiedade e no pânico.

1.6. ANSIEDADE, GLUTAMATO E ANTAGONISTAS NMDA

Diversos fármacos antidepressivos, após tratamento crônico, também são eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade, como o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno de pânico (TP; NASH; NUTT, 2005). Nesse sentido, é possível que a cetamina, além de apresentar efeito antidepressivo rápido e persistente, também apresente efeito ansiolítico ou panicolítico com essas características.

Além disso, evidências crescentes sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica pode estar envolvida nos mecanismos biológicos subjacentes à resposta ao estresse e transtornos relacionados à ansiedade (BERMUDO-SORIANO *et al.*, 2012). Os receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato estão distribuídos em regiões límbicas, como o hipocampo,

amígdala, córtex orbito-frontal, giro cingulado, córtex pré-frontal medial e ínsula, que estão relacionadas às respostas ao estresse e aos transtornos relacionados com a ansiedade (BERGINK; VAN MEGEN; WESTENBERG, 2004). O estresse agudo aumenta a liberação de glutamato na amígdala (REZNIKOV *et al.*, 2007). Também foi relatado que camundongos nocaute para a subunidade NR2A do receptor NMDA exibem um fenótipo nitidamente tipo-ansiolítico e antidepressivo (BOYCE-RUSTAY; HOLMES, 2006). Adicionalmente, a administração de antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA, por via intraperitoneal ou em regiões cerebrais como a amígdala basolateral e no hipocampo dorsal, produziram redução da ansiedade em diversos modelos animais (para revisão ver BERMUDO-SORIANO *et al.*, 2012).

A cetamina está entre os antagonistas NMDA cujos efeitos têm sido investigados em modelos experimentais de ansiedade, como pode ser observado na Tabela 1. Por exemplo, Engin e colaboradores (2009) mostraram que doses subanestésicas da cetamina induzem efeito tipo-ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE; ENGIN; TREIT; DICKSON, 2009) e revertem o tempo de congelamento induzido pelo modelo de medo condicionado (PIETERSEN *et al.*, 2006). E esse antagonista NMDA também reduziu o tempo de congelamento e diminuiu a latência para entrada no compartimento condicionado aversivo no aparato de esquiva inibitória (BABAR *et al.*, 2001). Contrariamente, porém, Silvestre e colaboradores (1997) observaram efeito ansiogênico de baixas doses da cetamina no LCE, embora aparentemente a droga tenha afetado a atividade locomotora dos animais (SILVESTRE *et al.*, 1997). Esses resultados contraditórios apontam a necessidade de mais investigações sobre o potencial efeito da cetamina em um modelo experimental como o LTE, que permite avaliar, através de diferentes procedimentos, comportamento relacionado ao Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) e comportamento relacionado ao Transtorno do Pânico (TP).

Tabela 1. Resultados de estudos pré-clínicos com Cetamina em diferentes modelos experimentais de ansiedade.

Estudo	Espécie	Dose e Via de Administração	Modelo Empregado	Efeito Observado
Brandão, Graeff, 1980.	Pombo	10 mg/kg i.m.	Resposta operante punida e não punida	Ef. Ansiogênico
		17 mg/kg i.m.	Resposta operante punida e não punida	Ef. Ansiogênico
Silvestre et al., 1997.	Ratos Wistar	7 mg/kg i.p.	Teste de Interação Social	Efeito Ansiogênico
			LCE	Efeito Ansiogênico
			Teste de Holeboard	Nenhum Efeito
Babar et al., 2001.	Ratos Wistar	3 mg/kg i.p.	Fuga de Uma Via	Nenhum Efeito
			Freezing Condicionado ao Medo	Nenhum Efeito
		10 mg/kg i.p.	Fuga de Uma Via	Efeito Ansiogênico
			Freezing Condicionado ao Medo	Efeito Ansiolítico
Hayase; Yamamoto; Yamamoto, 2006.	Camundongos Macho ICR	30 mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiolítico
		100mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiolítico
Engin; Treit; Dickson, 2009.	Ratos Sprague-Dawley	10 mg/kg i.p.	LCE	Nenhum Efeito
		50 mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiolítico
Da Silva et al., 2010	Camundongo Macho Swiss	5 mg/kg i.p.	LCE	Nenhum Efeito
		10 mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiogênico
		20 mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiogênico
Carrier; Kabbaj, 2013.	Ratos e Ratas Sprague-Dawley	2,5, 5 e 10 mg/kg i.p.	LCE	Nenhum Efeito
			Teste de Transição Claro-Escuro	Nenhum Efeito
Kilic et al., 2014.	Ratas Sprague-Dawley	3mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiolítico
Zhang et al., 2015.	Ratos Sprague-Dawley	0,625 mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiolítico
		1,25 mg/kg i.p.	LCE	Nenhum Efeito
		2,5 mg/kg i.p.	LCE	Efeito Ansiolítico
	Camundongos Machos ICR	0,625 mg/kg i.p.	"Freezing" Contextual	Nenhum Efeito
		1,25 mg/kg i.p.	"Freezing" Contextual	Efeito Ansiolítico
		2,5 mg/kg i.p.	"Freezing" Contextual	Efeito Ansiolítico

Abreviação: LCE, Labirinto em Cruz Elevado.

Vários estudos também sugerem que outro antagonista não competitivo de receptores NMDA, o MK-801, também induz efeito ansiolítico em modelos animais. Por exemplo, no LCE, o tratamento com MK-801 induziu um aumento no número de entradas nos braços abertos, indicando um possível efeito ansiolítico, sem modificar a atividade locomotora (ZARRINDAST *et al.*, 2011). Outros estudos também evidenciaram efeito ansiolítico do MK-801 no LCE (ENGIN; TREIT; DICKSON, 2009; KARCZ-KUBICHA *et al.*, 1997). O MK-801 também induziu efeito ansiolítico no teste de odor de gato, aumentando a frequência e duração dos parâmetros observados nesse teste (BLANCHARD *et al.*, 1992). Em outro estudo, a droga apresentou um perfil tipo-ansiolítico similar ao produzido pelo diazepam no Teste de Vogel, aumentando o lambar punido sem produzir alteração significativa no consumo livre e no limiar de estímulo anti-conflito. E ainda, aumentou a exploração no quadrante central no campo aberto sem produzir alteração na atividade locomotora (PLAZNIK *et al.*, 1994).

Nesse mesmo sentido, estudo prévio do nosso laboratório mostrou que o MK-801 (0,05mg/kg) prejudicou a esquivia inibitória e deixou inalterada a fuga no LTE. Esses resultados sugerem que o MK-801 induz efeito o tipo-ansiolítico rápido (SILOTE, 2013).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que a cetamina, administrada de forma aguda e 24 horas antes dos testes, poderia induzir efeitos ansiolítico e panicolítico em ratos expostos ao LTE. Nós ainda testamos a hipótese de que o efeito panicolítico da cetamina não seria decorrente do simples bloqueio do receptor NDMA, ou seja, outro antagonista NDMA, como o MK-801, não alteraria o comportamento relacionado com o pânico. Investigamos, ainda, se a cetamina administrada diretamente na MCPD induziria efeito panicolítico. E finalmente, considerando que o efeito antidepressivo rápido e persistente da cetamina parece depender da via de sinalização de BDNF/TrkB, avaliamos se a cetamina induziria a ativação de TrkB, consequente, fosforilação dos resíduos Y-706/707 e Y-515 na MCP.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos comportamentais induzidos pela cetamina em ratos expostos ao LTE e o possível envolvimento da via BDNF/TrkB na MCPD nesses efeitos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a hipótese de que o tratamento agudo sistêmico com doses subanestésicas (10 e 30 mg/kg) ou anestésica (80 mg/kg) de cetamina induziria efeito ansiolítico/panicolítico rápido em ratos submetidos ao LTE.
- Investigar se o tratamento agudo sistêmico com dose subanestésica ou anestésica de cetamina induziria efeito ansiolítico/panicolítico persistente em ratos submetidos ao LTE 24 horas após o tratamento.
- Testar a hipótese de que o MK-801 não induz efeito ansiolítico persistente em ratos submetidos ao LTE 24 horas após o tratamento.
- Testar a hipótese de que a cetamina administrada intra-MCPD induziria efeito tipo-panicolítico rápido em ratos submetidos ao LTE.
- Avaliar se a cetamina, na dose anestésica, aumentaria a fosforilação de TrkB nos resíduos Y-706/707 e Y-515 na MCPD de forma aguda e também após 24 horas.
- Testar a hipótese de que o MK-801 (0,05 mg/kg) não aumentaria a fosforilação de TrkB nos resíduos Y-706/707 e Y-515 na MCPD de forma aguda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos (280-400 g), provenientes do Biotério Central da UFES, mantidos em grupos de 4 a 5 animais, à temperatura de 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas tendo livre acesso à água e comida.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES através do certificado nº 048/2014 (Anexo A).

3.2. DROGAS

As drogas utilizadas para os testes comportamentais foram as seguintes:

- Cloridrato de Cetamina (Syntec, Brasil), antagonista não competitivo de receptor NMDA, nas doses de 10 e 30 mg/kg (doses subanestésicas com base nos estudos de KOIKE et al., 2013) e 80 mg/kg (dose anestésica empregada em nosso laboratório) por via intraperitoneal (i.p.). E 2 e 20µg/0,2 µL por via intra-MCPD.
- MK-801 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América (EUA)), antagonista não competitivo de receptor NMDA, na dose de 0,05 mg/kg (dose com base em estudo prévio em nosso laboratório; SILOTE, 2013) por via i.p.

As drogas utilizadas durante o procedimento cirúrgico foram as seguintes:

- 2,2,2-Tribromoetanol 2,5% (Sigma-Aldrich, EUA) por via i.p. na dose de 10mL/kg.
- Flunixinina Meglumina 50mg/mL (Schering-Plough, França) por via subcutânea (s.c.) na dose de 0,02 mL/animal.

- Lidocaína 2% e fenilefrina (S.S. White Artigos Dentários LTDA, Brasil) 0,2 mL administrado por anestesia infiltrativa.
- Pentabiótico Veterinário 1.200.000 UI (Fort Dodge, Brasil) Benzilpenicilina benzatina 600.000 UI, Benzilpenicilina procaína 300.000 UI, Benzilpenicilina potássica 300.000 UI, Sulfato de Diidroestreptomicina base 250 mg e Sulfato Estreptomicina base 250 mg via intramuscular (i.m.) na dose de 0.2 mL/animal.
- Uretana 25% (Sigma-Aldrich, EUA) por via i.p. na dose de 10mL/kg.

3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

O procedimento de cirurgia estereotáxica foi realizado em um grupo de animais para implantar cânula-guia (11,5 mm) na MCPD (Coordenadas: AP: + 1,5 mm; ML: + 2,0 mm; e DV: - 4,9 mm, ângulo 15° de acordo com o atlas de PAXINOS, WATSON, 2009).

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (10mL/kg) por via i.p.. Em seguida, a tricotomia da cabeça foi realizada para posterior fixação no aparelho estereotáxico (Stoelting Co., EUA). Na sequência, os animais receberam a injeção de um anestésico local (Lidocaína 2% com vasoconstritor) no local da incisão. Todo o tecido subcutâneo foi removido após uma incisão sagital, e fez-se dois orifícios na calota craniana para implantar parafusos de aço inoxidável, necessários para dar suporte à prótese craniana. E ainda, um terceiro orifício foi feito para implantar de forma unilateral a cânula-guia na MCPD. Depois disso, introduziu-se um mandril de aço inoxidável na cânula-guia para evitar obstrução. Um acrílico odontológico auto polimerizante foi utilizado para confeccionar uma prótese que auxiliará na fixação a cânula-guia à calota craniana. Por fim, para evitar qualquer infecção ou inflamação, os animais receberam por via i.m. o pentabiótico veterinário (0,2 ml/animal, Fort Dodge), e por via s.c. um antiinflamatório (0,02 ml/animal, Schering-Plough Animal Health) no dorso.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos sob uma lâmpada de 60 W até sua recuperação da anestesia, e posteriormente encaminhados ao biotério. Os experimentos iniciaram 5-7 dias após a cirurgia.

3.4. INJEÇÃO DE DROGAS E HISTOLOGIA

Nos experimentos em que houve administração de cetamina na MCPD, os animais receberam a injeção intra-MCPD 20 minutos antes da exposição ao modelo experimental. Para realizar a injeção de drogas, os animais foram imobilizados pelo experimentador para retirada do mandril e introdução de uma agulha odontológica (0,3 mm de diâmetro externo e 12,5 mm de comprimento) na cânula-guia. O volume de 0,2 μ L foi injetado por dois minutos com uso de bomba de infusão (Insight Ltda, Brasil). Para confirmar o fluxo da droga, foi observado o movimento da bolha de ar no tubo de polietileno (PE-10), no qual estava conectado à bomba de infusão e a agulha. A agulha foi retirada 60 segundos após o término da injeção, para evitar o refluxo da solução. Após os tratamentos, os animais permaneceram em uma caixa individual antes sessão experimental.

Ao término dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com uretana 25% (10mL/kg i.p.). Posteriormente, os animais receberam o corante azul de Evans a 1% injetado com a finalidade de marcar o local da injeção. Na sequência, os animais foram perfundidos intracardicamente com salina e formol a 10%, e os seus cérebros removidos e posteriormente armazenados em formol a 10%. Cortes coronais de 50 μ m dos cérebros foram feitos com um auxílio de um criostato Leica CM3050 S (Leica Microsystems, Alemanha), que foram analisados em microscópio óptico para determinação dos sítios de injeção de acordo com Atlas de PAXINOS & WATSON (2009).

3.5. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1. LTE

O teste é baseado no comportamento inato do rato de evitar locais abertos (ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). Esse modelo é derivado do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e foi desenvolvido por Graeff e colaboradores (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; ZANGROSSI *et al.*, 2001) para avaliar em um mesmo procedimento, dois tipos de ansiedade: ansiedade condicionada/aprendida e ansiedade incondicionada/inato. O LTE é constituído de 3 braços de iguais dimensões (50x10 cm), sendo um deles cercado por uma parede de 40 cm de altura (braço fechado - BF), perpendicular aos outros 2 cercados apenas por uma aresta de 0,5 cm (braço aberto - BAs). Conforme esquematizado na Figura 4. Inicialmente, os animais foram submetidos ao handling por dois dias anteriormente à pré-exposição, com a finalidade de habituar o animal ao experimentador, e assim reduzir o estresse provocado pela manipulação dele (POBBE *et al.*, 2014). O handling consiste na gentil manipulação de cada animal por 5 minutos (POBBE *et al.*, 2014).

Vinte e quatro horas antes do teste, os animais foram pré-expostos a um dos BAs do LTE por 30 minutos. A pré-exposição foi realizada isolando o BA com uma barreira, seguido da exposição do animal por 30 minutos no braço. Esse procedimento permite que o animal explore livremente o ambiente, o que por consequência minimiza o comportamento exploratório no dia do teste, e facilita a detecção do efeito da droga na fuga (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000).

Vinte e quatro horas depois da pré-exposição, os animais foram testados de acordo com o procedimento descrito a seguir.

Esquiva inibitória: os animais foram colocados no BF e realizou-se em 3 tentativas sucessivas (esquiva basal, esquiva inibitória 1 e esquiva inibitória 2) nas quais se mede o tempo para os animais deixarem o BF (medida de acordo com (BEIJAMINI; ANDREATINI, 2003; GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993 SILOTE *et al.*, 2013).

Fuga: Trinta segundos após a Esquiva Inibitória, os animais foram colocados na extremidade de um dos BAs, que também foi executado em três tentativas sucessivas, nas quais se mede o tempo para os animais deixarem esse BA (Fuga 1, 2 e 3). O tempo de permanência máxima no labirinto em cada tentativa, tanto na esquiva inibitória quanto na fuga, que correspondeu a 300 s.

Ao final de cada animal testado, foi efetuada a limpeza do aparelho com papel toalha e álcool a 10 %, com o objetivo de evitar que o odor e as secreções de um rato interferissem no comportamento de outro. Um pesquisador treinado e cego ao tratamento cronometrou a latência de esquiva e fuga durante os experimentos.

Fármacos antidepressivos empregados no tratamento do TAG e do TP reduzem a latência na esquiva inibitória e aumentam a latência de fuga, efeitos interpretados como ansiolítico e panicolítico, respectivamente (POLTRONIERI; ZANGROSSI; DE BARROS VIANA, 2003).

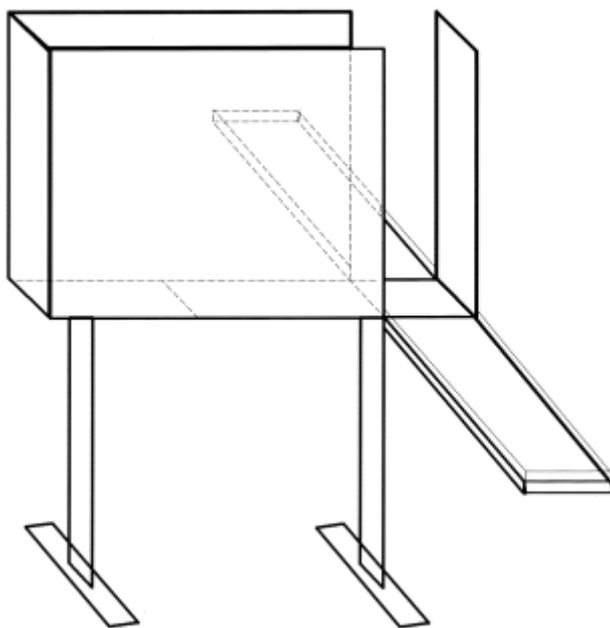


Figura 4. Ilustração esquemática do LTE (ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

3.5.2. CAMPO ABERTO

Este modelo é empregado para avaliar a atividade locomotora dos ratos tratados com as diversas substâncias. O Campo Aberto consiste em uma caixa de madeira (1 m² de área) com fundo preto, de acordo com esquema na Figura 5. Sob a arena existem uma lâmpada emitindo luz brilhante.

Os animais foram colocados individualmente no centro do Campo Aberto, imediatamente após terem sido submetidos ao LTE, e seu comportamento registrado por câmara de vídeo (Logitech HD C270, Suíça) por 5 minutos, e posteriormente, a análise foi processada através do software ANYMAZE (Stoelting Co., EUA), com a observação da distância total percorrida efetuada pelo animal.

A limpeza do aparelho foi realizada com papel toalha e álcool a 10 %, após cada animal testado, com o objetivo de evitar que o odor e as secreções de um rato interferissem no comportamento de outro.

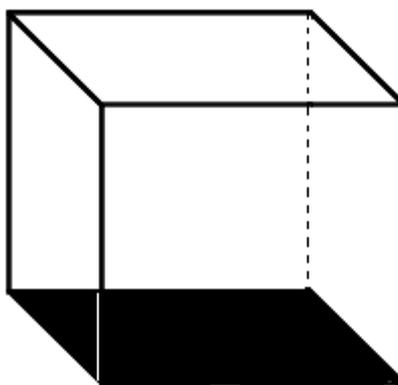


Figura 5. Ilustração esquemática do aparato do Campo Aberto.

3.6. QUANTIFICAÇÃO DE TrkB TOTAL, pTrkB Y-705/706, pTrkB Y-515

3.6.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram decapitados sem anestesia para a remoção da MCP, já que alguns estudos apontam que diferentes anestésicos interferem na expressão de Trk (VUTSKITS *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2014). Depois da decapitação e da remoção da calota craniana com um alicate, o cérebro foi removido com auxílio de uma espátula. Na sequência, posicionou-se o cérebro no *brain slicer* de acrílico e com uma lâmina posicionada a porção rostral do cérebro, o bulbo olfatório foi removido. Com outra lâmina posicionada na porção caudal, foi removido o cerebelo. A MCP foi coletada a partir do fatiamento do cérebro, no qual se cortou uma fatia de 2 mm de espessura, na porção caudal do cérebro. Na sequência, colocou-se a fatia em uma placa de petri de fundo escuro com o papel de filtro molhado com solução salina gelada. Uma vez identificada a MCP, com um punch (2mm de diâmetro) o tecido foi coletado na região do aqueduto cerebral e transferido para um eppendorf contendo 50 µL de tampão RIPA (Sigma-Aldrich, EUA; 150 mM NaCl 150 mM, IGEPAL® CA-630 1,0%, deoxicolato de sódio 0, 5%, SDS 0,1%, e Tris 50 mM, pH 8,0) complementado com inibidores de protease e de fosfatase (Ortovanadato de sódio e Coquetel de inibidor de fosfatase 3 (Sigma-Aldrich, EUA)). Depois disso, os tecidos cerebrais foram macerados no tampão, usando um homogeneizador (Dremel 7700 7.2V MultiPro, EUA), e as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises moleculares.

O modo de preparo do tampão complementado com inibidores de protease e fosfates está no Anexo B.

3.6.2. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Antes da determinação de TrkB total, pTrkB Y-705/706, pTrkB Y-515 e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) na MCP, o conteúdo de

proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Primeiramente, 1 μL da amostra foi diluída em 99 μL de água ultra pura em uma microplaca a parte. Depois, adicionou-se 50 μL das amostras diluídas aos poços da placa de ELISA. Para fazer a diluição seriada da solução padrão de albumina bovina (BSA; Sigma-Aldrich, EUA), foi adicionado 50 μL de água ultra pura em oito poços. No primeiro poço, 50 μL de BSA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi acrescentado e homogeneizado. Depois, aspirou-se 50 μL da mistura do primeiro poço, e o adicionou e homogeneizou no segundo poço, e assim sucessivamente até o sétimo poço até obter a concentração de 0,0078125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA. Para fazer a diluição seriada dos padrões deve-se seguir como na Figura 6.

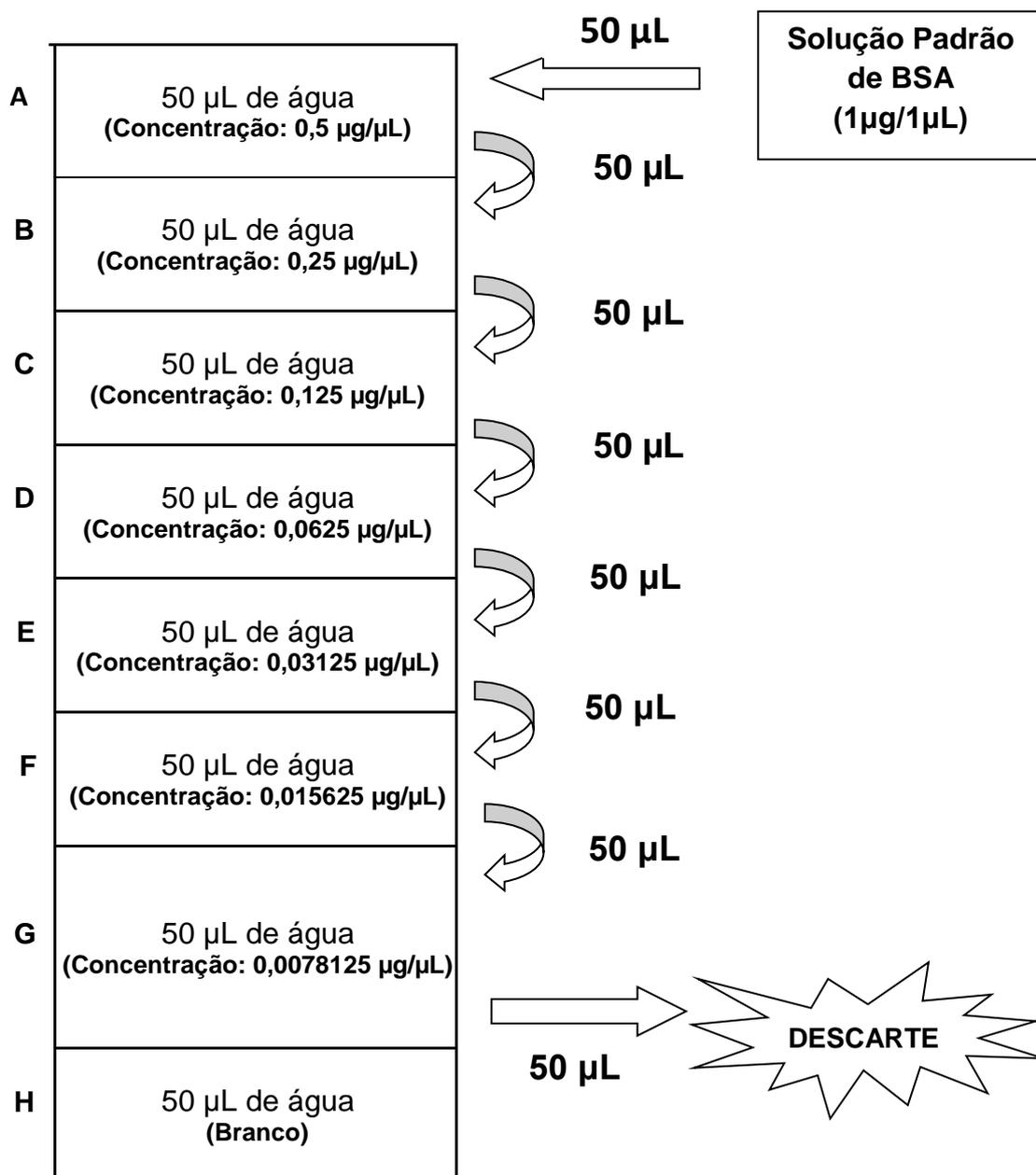


Figura 6. Representa o esquema de diluição seriada da solução padrão de BSA 1µg/1µL na microplaca de ELISA.

Por fim, o adicionou-se 170 µL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA) em todos os poços da microplaca e as bolhas foram removidas. Logo em seguida, as leituras das microplacas foram feitas em um leitor Spectra Max utilizando o comprimento de onda de 595 nm no visível. Essa leitura foi feita imediatamente após a adição do reagente de Bradford pelo fato dele precipitar rapidamente.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DE TrkB E pTrkB NO RESÍDUO Y-515 E Y-705/706 POR WESTERN BLOTTING

Para a determinação do TrkB Total, pTrkB Y-515, do pTrkB Y-706/707 e do GAPDH, um volume da amostra da MCP perfazendo 100 µg de proteínas totais (determinada pelo método descrito por Bradford; BRADFORD, 1976) foram separadas por eletroforese com gel SDS-PAGE (Gel de poli(acrilamida de dodecilsulfato de sódio ; Gel de entrada 7% e gel de separação 10 e 13 %). A corrente aplicada na eletroforese inicialmente foi 80 V por 40 minutos para favorecer o empacotamento das proteínas no gel, em seguida aplicou-se uma corrente de 100 V por 3 horas e 40 minutos com a fonte PowerPac HC (Bio-rad, EUA), para ocorrer à separação das proteínas através do peso molecular (PM) de cada uma. Depois disso, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente ativada em metanol por 10 segundos e tampão de transferência por 10 minutos. Antes da transferência, o sanduíche foi montado no suporte para western blot, no qual foi colocado na seguinte ordem: espuma, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro e espuma. Vale ressaltar que a membrana apresenta duas diferentes faces, uma lisa e outra áspera, e que a face lisa ficou em contato com o gel. Depois disso, o suporte com os sanduíches e o gelo reciclável foram colocados na cuba de transferência, e preencheu-se a cuba com tampão de transferência até cobrir o sanduíche. A transferência foi realizada com uma corrente de 100 V por uma hora e 30 minutos, com a fonte PowerPac HC (Bio-rad, EUA).

Após a transferência, as membranas foram removidas do sanduíche e cortadas entre o PM de 50 e 37 KDa para permitir a incubação simultânea com dois anticorpos primários anti-pTrkB e anti-GAPDH. A identificação do local do corte na membrana foi possível devido à presença de um padrão de PM caleidoscópico (Precision Plus Protein Standards – Kaleidoscope; Bio-Rad, EUA) que foi corrido e transferido junto com as amostras. Depois da lavagem da membrana com TBST 0,1% (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%; pH 7.6) por 5 minutos e do bloqueio com solução de soroalbumina bovina (BSA) a 5% em tampão TBST por 1 hora, metade das membranas com PM acima de 50 KDa foram incubadas com o anticorpo primário anti-

pTrkB Y-515 (1:1000 em BSA 1% em TBST; Abcam, Cambridge, EUA) ou anti-pTrkB Y-706/707 (1:1000 em BSA 5% em TBST; Cell Signaling Technology, EUA), e nas abaixo de 50 KDa, foram incubadas contra o normalizador anti-GAPDH (1:2000 em BSA 5% em TBST; Santa Cruz, EUA) por 3 dias a 4°C. Na sequência, as membranas foram lavadas com 5mL de TBST 0,1% por 5 minutos, e depois incubadas por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:2000 em BSA 5% em TBST; Santa Cruz, EUA). Após as três lavagens por 5 minutos com TBST 0,1% e com TBS, as membranas foram incubadas com substrato cromogênico para a peroxidase (Perkin Elmer, EUA; SAARELAINEN et al., 2003). A marcação cromogênica das bandas de proteínas foi escaneada, e a densidade óptica determinada com o software Image J. Os valores de densidade óptica de cada amostra foram normalizados pelos valores encontrados para TrkB total e expressos como porcentagem sobre o grupo controle. O esquema do método WB está representado na Figura 7.

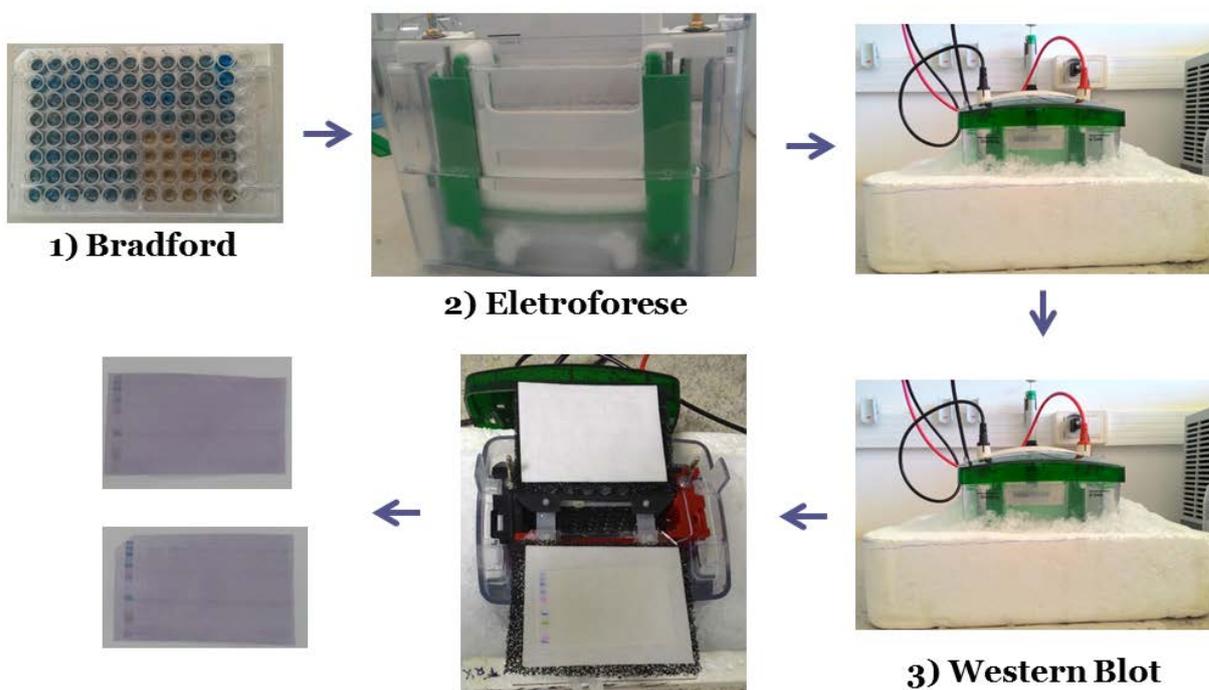


Figura 7. Figura esquemática do método do Western Blot. Primeiro foi feita a quantificação das proteínas totais da amostra pelo método de Bradford (1). Depois foi feita a separação das proteínas da amostra através do peso molecular (PM) por eletroforese em gel de SDS-PAGE (2). Na sequência, as proteínas do gel foram transferidas para a membrana de PVDF para posterior incubação com anticorpo primário contra pTrkB Y-515, do pTrkB Y-705/706, TrkB Total e do GAPDH (Normalizador), e incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase, e depois com substrato cromogênico para a enzima, leitura da densidade óptica da Image J (3).

Para determinação do TrkB total das amostras, as membranas com PM acima de 50 KDa sofreram o processo de *stripping*. Esse consiste em remover a marcação cromogênica e os anticorpos previamente aderidos à membrana, para permitir a incubação com diferentes anticorpos e uma nova marcação cromogênica. Para isso, a membrana foi lavada com TBS, e depois com metanol puro até sair todo o reagente de cor. Em seguida, ela foi bem lavada com água ultra pura até remoção do metanol, e colocada no tampão de Harsh (3M de Tris pH 6,8, 20% de SDS, água e β -Mercaptoetanol) previamente aquecido a 60° C por 7 minutos. Depois as membranas foram lavadas duas vezes em 30 a 40mL de TBST 0,1% por 5 minutos, e duas vezes com 30 a 40 mL de TBS pelo mesmo tempo. Na sequência, certificou-se que o cheiro forte do β -Mercaptoetanol havia sido removido. Em caso negativo, as lavagens

foram repetidas. Após essa fase, as membranas foram bloqueadas com BSA 3% por 2 horas à temperatura ambiente. O anticorpo anti-TrkB total (1:1000 em BSA 3% em TBST; Cell Signalling Technology, EUA) por 3 dias a 4°C. O procedimento para incubar com anticorpo secundário, da marcação cromogênica e a análise da densidade óptica empregada foram os mesmos para os anticorpos anti-pTrkB Y-515, do anti-pTrkB Y-705/706 e do anti-GAPDH conforme descrito anteriormente.

3.7. DESENHO EXPERIMENTAL

3.7.1. EXPERIMENTO 1

Efeito da Cetamina (10 ou 30 ou 80 mg/kg) ou da salina, administradas por via intraperitoneal (i.p.) de forma aguda antes do teste em ratos submetidos ao LTE.

A cetamina nas doses de 10 e 30 mg/kg foi administrada por via i.p. 45 minutos antes do teste comportamental. Já para a dose de 80 mg/kg, grupos independentes foram testados 2 horas após a injeção de cetamina ou salina, tempo necessário para o animal se recuperar da anestesia e a atividade locomotora retornar ao normal. Grupos experimentais foram os seguintes: A) Grupo I: Salina (n=15); Cetamina 10mg/kg (n=13); Cetamina 30 mg/kg (n=11); B) Grupo II: Salina (n=13); Ketamina 80mg/kg (n=16).

3.7.2. EXPERIMENTO 2

Efeito da Cetamina (10 ou 30 ou 80 mg/kg) ou da salina, administradas antes da pré-exposição e 24 horas antes do teste por via i.p. em ratos submetidos ao LTE.

A cetamina nas doses de 10 e 30 mg/kg foi administrada por via i.p. 45 minutos antes da pré-exposição e aproximadamente 24 horas antes do teste. No caso da dose anestésica (80mg/kg), grupos independentes de ratos receberam salina ou cetamina 2 horas antes da pré-exposição e aproximadamente 24

horas antes do teste comportamental. Os grupos experimentais foram os seguintes: A) Grupo I: Salina (n=12); Cetamina 10mg/kg (n=12); Cetamina 30 mg/kg (n=10); B) Grupo II: Salina (n=13); Ketamina 80mg/kg (n=13).

3.7.3. EXPERIMENTO 3

Efeito do MK-801 (0,05 mg/kg) ou da salina, administradas antes da pré-exposição e 24 horas antes do teste por via i.p. em ratos submetidos ao LTE.

O MK-801 na dose de 0,05 mg/Kg foi administrada por via i.p. 45 minutos antes da pré-exposição e aproximadamente 24 horas antes do teste. Grupos experimentais foram os seguintes: Salina (n=10); MK-801 0,05 mg/kg (n=11).

3.7.4. EXPERIMENTO 4

Efeito agudo da cetamina (2 ou 20 µg/0,2 µL) administrada via intra-MCPD em ratos submetidos ao LTE.

A cetamina nas doses de 2 e 20 µg/0,2 µL foram administradas por via intra-MCPD 20 minutos antes do teste comportamental. Grupos experimentais foram os seguintes: Salina (n=7); Cetamina 2 µg/0,2 µL (n=9); Cetamina 20 µg/0,2 µL (n=9).

3.7.5. EXPERIMENTO 5

Efeito agudo da Cetamina (80 mg/kg) ou da salina administradas por via i.p. na expressão de TrkB total e pTrkB Y-515 e pTrkA(Y-674/675)/ pTrkB Y-706/707 na MCP.

Os animais receberam Cetamina na dose de 80 mg/kg e foram decapitados 2 horas após a administração das drogas para dissecação da MCP. Esses animais foram pré-expostos ao braço aberto do LTE 24 horas antes da decapitação. Os grupos experimentais foram os seguintes: **A) pTrkB Y-**

706/707: Salina (n= 7); e Cetamina 80 mg/kg (n=4); **B) pTrkB Y-515:** Salina (n= 5); e Cetamina 80 mg/kg (n=6);

3.7.6. EXPERIMENTO 6

Efeito agudo do MK-801 (0,05 mg/kg) ou da salina administradas por via i.p. na expressão de TrkB total e pTrkB Y-515 e pTrkA Y-674/675/ pTrkB Y-706/707 na MCP.

Os animais receberam MK-801 na dose de 0,05 mg/kg e foram decapitados 45 minutos após a administração das drogas para dissecação da MCP. Os grupos experimentais foram os seguintes: **A) pTrkB Y-706/707:** Salina (n=5); e MK-801 0,05 mg/kg (n=6); **B) pTrkB Y-515:** Salina (n=5); e MK-801 0,05 mg/kg (n=6).

3.7.7. EXPERIMENTO 7

Efeito da Cetamina (10 mg/kg) ou da salina administradas por via i.p. antes da pré-exposição e aproximadamente 24 horas na expressão de TrkB total e pTrkB Y-515 e pTrkA(Y-674/675)/ pTrkB Y-706/707 na MCP.

Os animais receberam Cetamina 10 mg/Kg ou salina 45 minutos antes da pré-exposição e foram decapitados aproximadamente após 24 horas para dissecação da MCP. Os grupos experimentais foram os seguintes: **A) pTrkB Y-706/707:** Salina (n=5); Cetamina 10 mg/kg (n=6) ; **B) pTrkB Y-515:** (Salina (n=5); Cetamina 10 mg/kg (n=6).

3.7.8. EXPERIMENTO 8

Efeito da Cetamina (10 ou 80 mg/kg) ou da salina administradas por via i.p. antes da pré-exposição e aproximadamente 24 horas na expressão de TrkB total e pTrkB Y-515 e pTrkA(Y-674/675)/ pTrkB Y-706/707 na MCP.

Os animais receberam Cetamina 80 mg/Kg ou salina duas horas antes da pré-exposição foram decapitados aproximadamente após 24 horas para dissecação da MCP. Os grupos experimentais foram os seguintes: **A) pTrkB Y-706/707**: Salina (n=6); Cetamina 80 mg/kg (n=7) ; **B) pTrkB Y-515**: Salina (n=5); Cetamina 80 mg/kg (n=6).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do LTE foram analisados com o programa de estatística Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0 para Windows (IBM SPSS Statistics®, Chicago, IL, EUA). e os da análise da expressão de TrkB total e pTrkB Y-515 e pTrkA(Y-674/675)/ pTrkB Y-706/707 na MCP, com o GraphPad Prims 5. A análise do comportamento de esquiva foi realizada empregando uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, com tratamento como fator independente e tentativas (Esquiva basal, Esquiva 1 e 2) como fator dependente. Efeitos significantes no fator independente ou na interação entre fatores dependentes e independentes foram seguidos de uma ANOVA de uma via e Teste post hoc de Dunnett quando apropriado para comparações entre os grupos para cada uma das esquivas. Os dados da fuga do LTE e do campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do Teste de Dunnett quando apropriado para comparações entre os grupos.

Os dados da fuga e do campo aberto, dos animais tratados com cetamina 80 mg/kg, e da análise da quantidade de TrkB total, pTrkB Y-515 e pTrkA(Y-674/675)/ pTrkB Y-706/707 na MCP foram analisados por Teste t de Student. Nessa análise, foram feitas comparações entre os grupos.

Os resultados do comportamento foram representados como a média e erro padrão da média (EPM), e da análise bioquímica, porcentagem do controle com a normalização para o TrkB total. O nível de significância usado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Os resultados de uma única injeção de cetamina (10 mg/kg e 30 mg/kg) 45 minutos antes do teste no LTE são mostrados na Figura 8. A ANOVA de medidas repetidas revelou que a esquiva inibitória foi adquirida no decorrer do teste ($F_{(1,38)} = 39,017$; $p < 0,0001$), no entanto não mostrou a interação tratamento x esquiva ($F_{(2,38)} = 1,838$; $p = 0,173$), e também não mostrou nenhum efeito estatisticamente significativo no tratamento ($F_{(2, 38)} = 0,933$; $p = 0,402$). Na fuga, o tratamento com a cetamina administrada 45 minutos antes do teste não afetou a latência na fuga em nenhuma das tentativas (Fuga 1: $F_{(2, 40)} = 1,476$; $p = 0,241$; Fuga 2: $F_{(2, 40)} = 1,197$; $p = 0,313$; Fuga 3: $F_{(2, 40)} = 0,312$; $p = 0,734$).

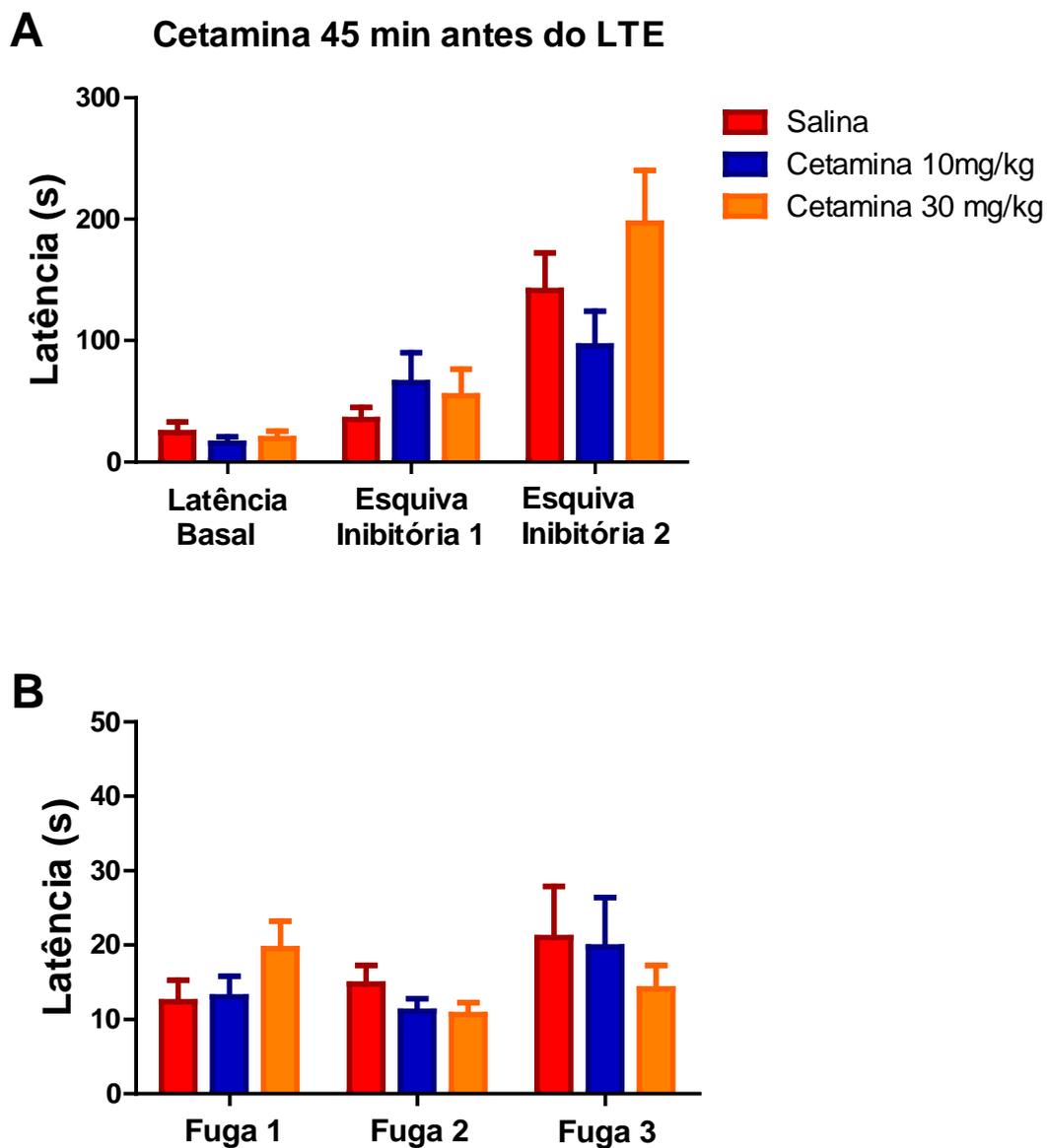


Figura 8. Latência na Esquiva Inibitória (A) ou na fuga (B) de ratos tratados por via intraperitoneal com salina (Grupo controle; n=16) ou cetamina nas doses de 10 mg/kg (n=14) ou 30 mg/kg (n=11) 45 minutos antes do LTE. Dados representam a média \pm EPM.

A tabela 2 mostra que o tratamento com a cetamina (10 e 30 mg/kg) não alterou a distância total percorrida ($F_{(2, 39)} = 0,23$; $p = 0,795$) pelos ratos no campo aberto quando comparado com o grupo salina.

Tabela 2. Distância total percorrida de ratos tratados com salina (n=15) ou Cetamina nas doses de 10 mg/kg (n=13) ou de 30 mg/kg (n=11) 45 minutos antes do LTE e do campo aberto.

Tratamento	Distância Total (cm)
Salina	1730,87 ± 376,08
Cetamina 10 mg/kg	1298,94 ± 171,92
Cetamina 30 mg/kg	1744,11 ± 224,31

Nota: Dados representam média ± EPM.

Os resultados de uma única injeção de cetamina (80 mg/kg) 2 horas antes do teste no LTE é mostrado na Figura 9. A ANOVA de medida repetida revelou que a esQUIVA inibitória foi adquirida no decorrer do teste ($F_{(1,27)} = 27,054$; $p < 0,0001$) e mostrou a interação tratamento x esQUIVA ($F_{(1,27)} = 5,732$; $p = 0,024$), entretanto não mostrou nenhum efeito estatisticamente significativo no tratamento ($F_{(1, 27)} = 0,015$; $p = 0,903$). O teste t revelou que o tratamento não afetou a latência na esQUIVA em nenhuma das tentativas (EsQUIVA basal: $t_{(27)} = 0,482$; $p = 0,062$; EsQUIVA inibitória 1: $t_{(27)} = 0,482$, $p = 0,633$; EsQUIVA Inibitória 2: $t_{(27)} = 0,974$, $p = 0,339$). Já na fuga, o tratamento com essa dose de cetamina prejudicou a latência na fuga 1 ($t_{(27)} = -2,22$; $p = 0,035$) quando comparado com o grupo controle (salina), o que é interpretado como efeito tipo-panicolítico e deixou inalteradas as outras tentativas (Fuga 2: $t_{(27)} = -0,424$; $p = 0,675$; Fuga 3: $t_{(27)} = 0,263$; $p = 0,794$).

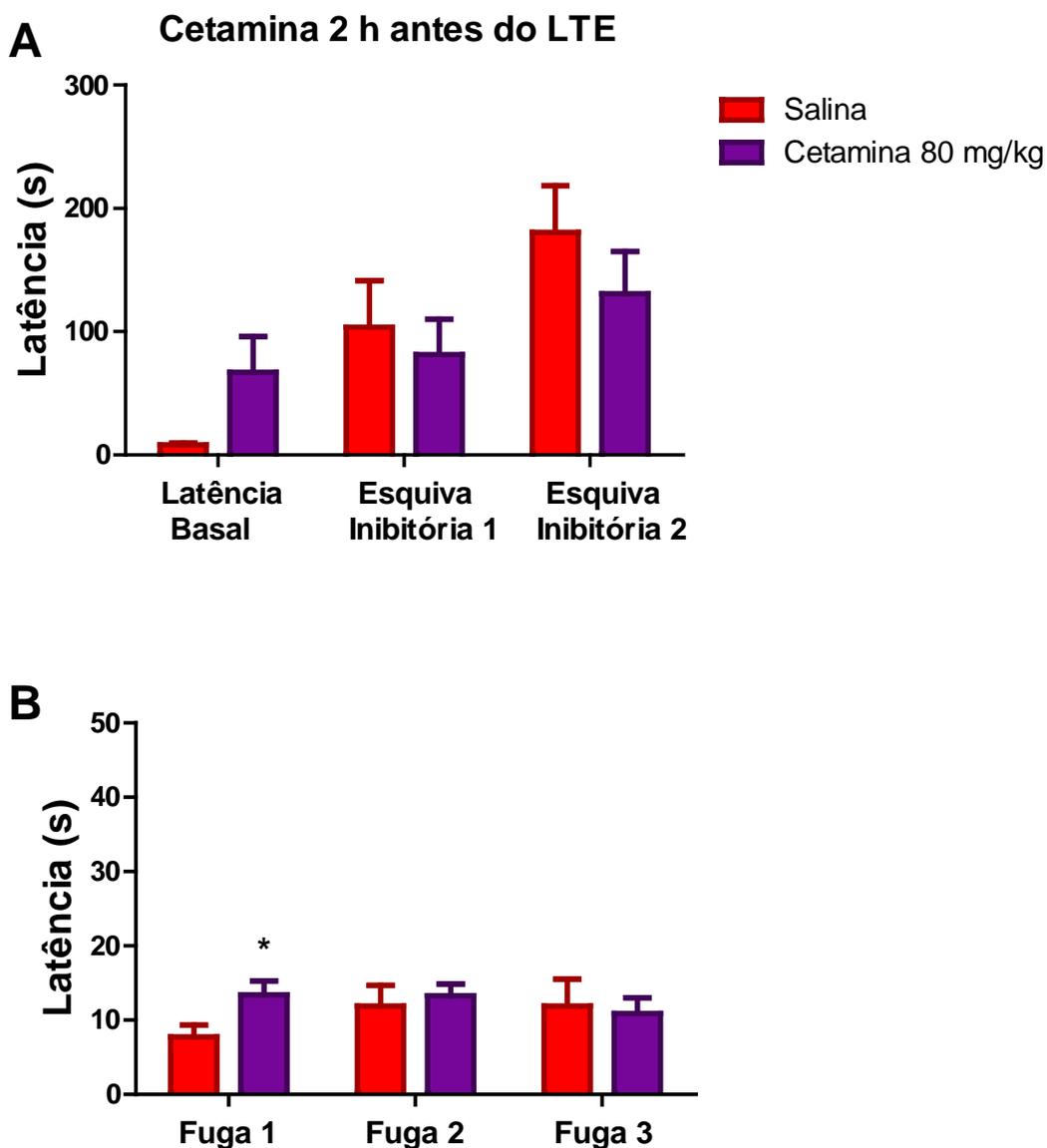


Figura 9. Latência na Esquiva Inibitória (A) ou na fuga (B) de ratos tratados por via intraperitoneal com salina (Grupo controle; n=13) ou cetamina na dose de 80 mg/kg (n=16) 2 horas antes do LTE. Dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo salina na respectiva fuga (Teste t de Student).

A tabela 3 mostra que o tratamento com a cetamina na dose anestésica não alterou a distância total percorrida ($t_{(27)} = -1,482$; $p = 0,150$) pelos ratos no campo aberto quando comparado com o grupo salina.

Tabela 3. Distância total percorrida de ratos tratados com salina (n=13) ou Cetamina 80 mg/kg (n=16) 2 horas antes do LTE e do campo aberto.

Tratamento	Distância Total (cm)
Salina	1843,1 ± 194,6
Cetamina 80 mg/kg	2421,4 ± 313,4

Notas: Dados representam média ± EPM.

Para avaliar se a pré-exposição, que é um fator estressante para o animal, interfere nos resultados da cetamina no LTE, os seguintes experimentos foram conduzidos: 1) Cetamina na dose de 10 e 30 mg/kg foram injetadas por via i.p. 45 minutos antes da pré-exposição ao LTE e cerca de 24 horas antes da realização do teste; e 2) Cetamina na dose de 80 mg/kg foi injetada por via i.p. 2 horas antes da pré-exposição ao LTE e cerca de 24 horas antes do teste.

A Figura 10 mostra os resultados da injeção da cetamina 45 minutos antes da pré-exposição por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 10 e 30 mg/kg. A ANOVA de medidas repetidas revelou que a esquiva inibitória foi adquirida durante o teste ($F_{(2,31)} = 46,482$; $p < 0,0001$) e não mostrou nenhum efeito significativo no tratamento ($F_{(2, 31)} = 0,299$; $p = 0,744$) ou na interação tratamento x esquiva ($F_{(2, 31)} = 0,035$; $p = 0,966$). A ANOVA de uma via mostrou que a cetamina afetou a latência da fuga 1 ($F_{(2,33)} = 4,549$; $p = 0,019$) e deixou inalteradas as outras tentativas (Fuga 2: $F_{(2, 33)} = 0,246$; $p = 0,784$; Fuga 3: $F_{(2, 33)} = 1,736$; $p = 0,193$).

A análise *post hoc* revelou que a cetamina (10 mg/kg) facilitou a Fuga 1 quando comparado com grupo controle (Teste de Dunnett, $p = 0,011$), o que pode ser interpretado como efeito tipo-panicogênico.

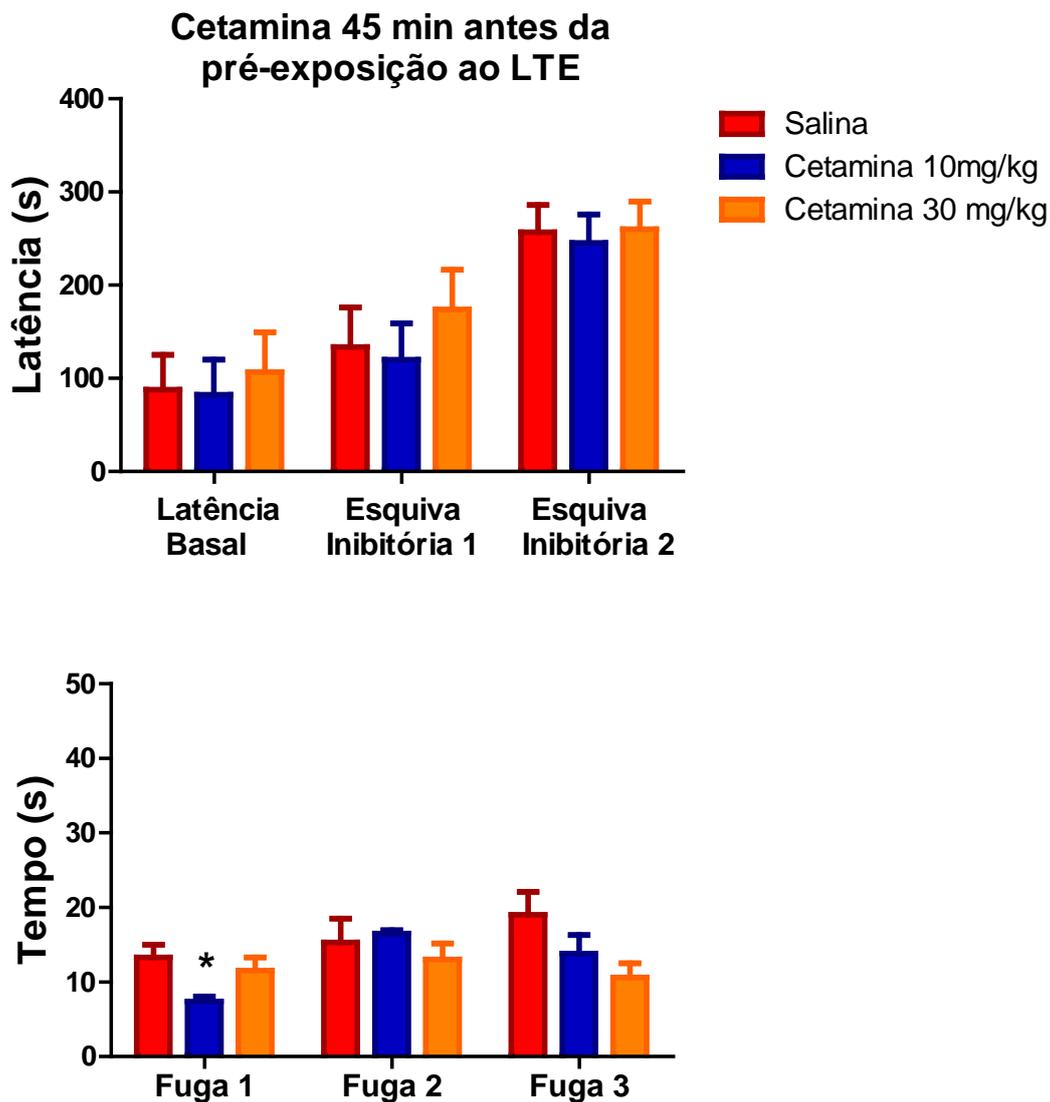


Figura 10. Latência na Esquiva Inibitória (A) e na Fuga (B) de ratos tratados por via intraperitoneal com salina (Grupo controle; n=12) ou Cetamina nas doses de 10 mg/kg (n=12) ou 30 mg/kg (n=10) 45 minutos antes da pré-exposição ao LTE e 24 horas antes do teste. Dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo salina na respectiva fuga (ANOVA seguida de Dunnett).

A tabela 4 mostra que a cetamina (10 e 30 mg/kg) não alterou a distância total percorrida ($F_{(2,33)} = 0,804$; $p = 0,456$) quando comparado com o grupo salina.

Tabela 4. Distância total percorrida de ratos tratados com salina (n=12) ou Cetamina nas doses de 10 mg/kg (n=12) ou de 30 mg/kg (n=10) 45 minutos antes da pré-exposição, 24 horas antes do LTE e do campo aberto.

Tratamento	Distância Total (cm)
Salina	1493,29 ± 178,94
Cetamina 10 mg/kg	1374,08 ± 215,45
Cetamina 30 mg/kg	1574,81 ± 219,95

Notas: Dados representam média ± EPM.

A Figura 11 mostra os resultados da cetamina 80 mg/kg administrada 2 horas antes da pré-exposição ao LTE. A ANOVA de medidas repetidas revelou que a esquiva inibitória foi adquirida durante o teste ($F_{(1,24)} = 46,617$; $p < 0,0001$), e também mostrou efeito significativo do tratamento ($F_{(1,24)} = 6,987$; $p = 0,014$) e da interação tratamento x esquiva ($F_{(1, 24)} = 2,529$; $p = 0,125$). O Teste t para amostras independentes mostrou que a cetamina (80mg/kg) facilitou a esquiva basal ($t_{(24)} = -2,754$; $p = 0,017$) e a esquiva inibitória 1 ($t_{(24)} = -2,670$; $p = 0,014$) quando comparado ao grupo salina, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico, e deixou a esquiva inibitória 2 inalterada ($t_{(24)} = -0,338$, $p = 0,738$).

A cetamina prejudicou a fuga 1 ($t_{(24)} = -2,15$; $p = 0,042$), ou seja, aumentou a latência para a fuga quando comparado ao grupo controle, caracterizando efeito tipo-panicolítico. A mesma dose não alterou as outras tentativas de fuga (Fuga 2: $t_{(24)} = 0,275$; $p = 0,786$; Fuga 3: $t_{(24)} = -1,181$; $p = 0,249$).

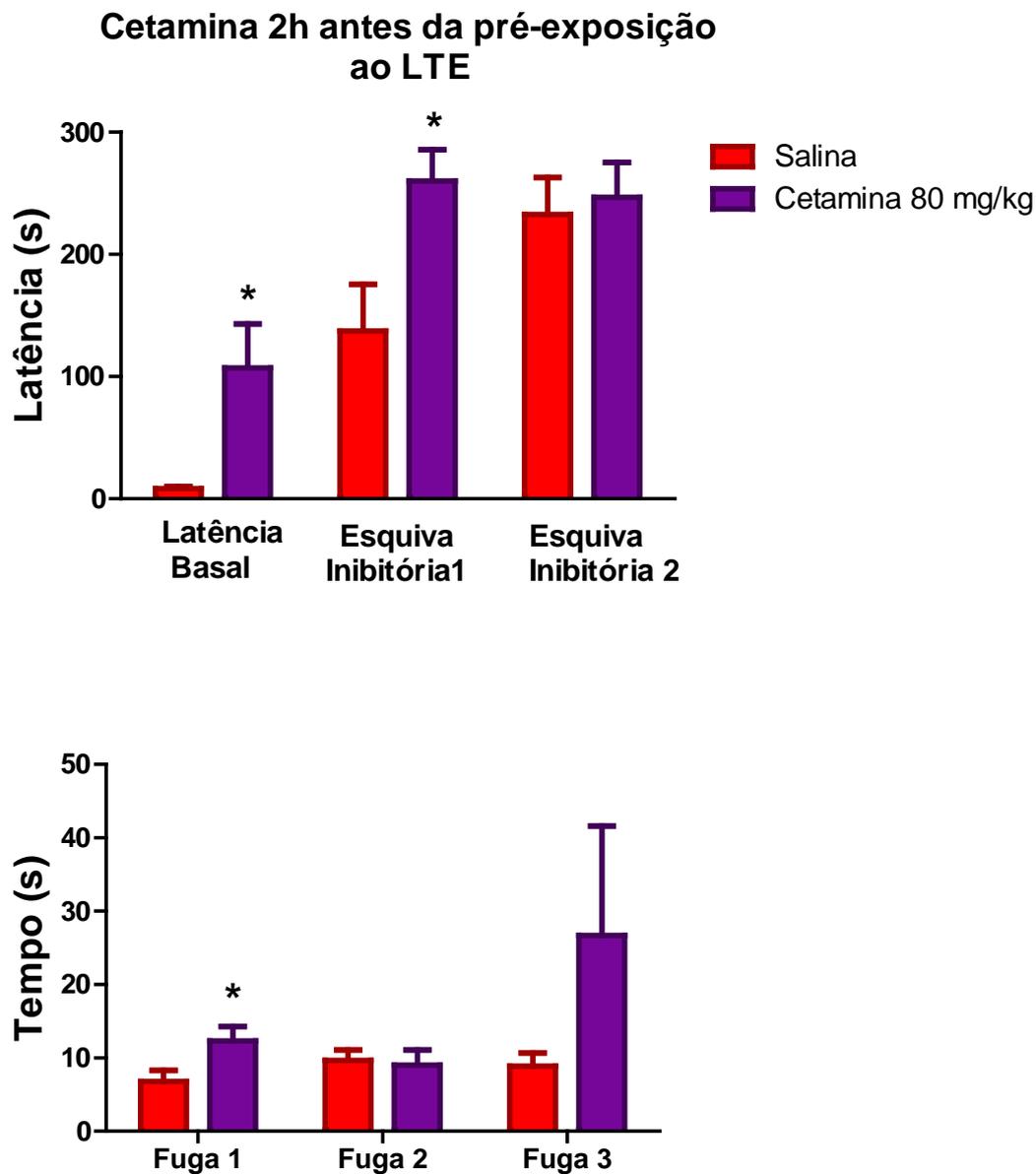


Figura 11. Latência na Esquiva Inibitória (A) e na Fuga (B) de ratos tratados por via intraperitoneal com salina (Grupo controle; n=13) ou cetamina na dose de 80 mg/kg (n=13) 2 horas antes da pré-exposição ao LTE e 24 horas antes do teste. Dados representam a Média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo salina na respectiva esquiva e fuga (ANOVA seguida de Dunnett).

A tabela 5 mostra que o tratamento com a cetamina 80 mg/kg não alterou a distância total percorrida pelo animal ($t_{(24)} = -0,232$; $p = 0,818$) quando comparado com o grupo salina.

Tabela 5. Distância total percorrida de ratos tratados com salina (n=13) ou Cetamina 80 mg/kg (n=12) por via intraperitoneal 2 horas antes da pré-exposição, 24 horas antes do LTE e imediatamente após colocados no campo aberto.

Tratamento	Distância Total (cm)
Salina	1319,67 ± 134,55
Cetamina 80 mg/kg	1374,09 ± 191,69

Nota: Dados representam média ± EPM.

Assim como para a cetamina, foi verificado se o MK-801 0,05 mg/kg poderia induzir uma alteração no comportamento do animal exposto ao LTE 24 horas após a injeção (Figura 12). A ANOVA de medida repetida revelou que a esquiva inibitória foi adquirida ao longo do teste ($F_{(1,18)} = 34,601$; $p < 0,0001$) e não mostrou nenhum efeito significativo na interação tratamento x esquiva ($F(1,19) = 0,703$; $p = 0,412$) ou no tratamento ($F(1,19) = 0,316$; $p = 0,581$). O tratamento com o MK-801 45 minutos antes da pré-exposição no LTE não afetou a latência na fuga em nenhuma das tentativas (Fuga 1: $t_{(19)} = 1,093$; $p = 0,288$; Fuga 2: $t_{(19)} = -0,194$; $p = 0,848$; Fuga 3: $t_{(19)} = 0,286$; $p = 0,778$).

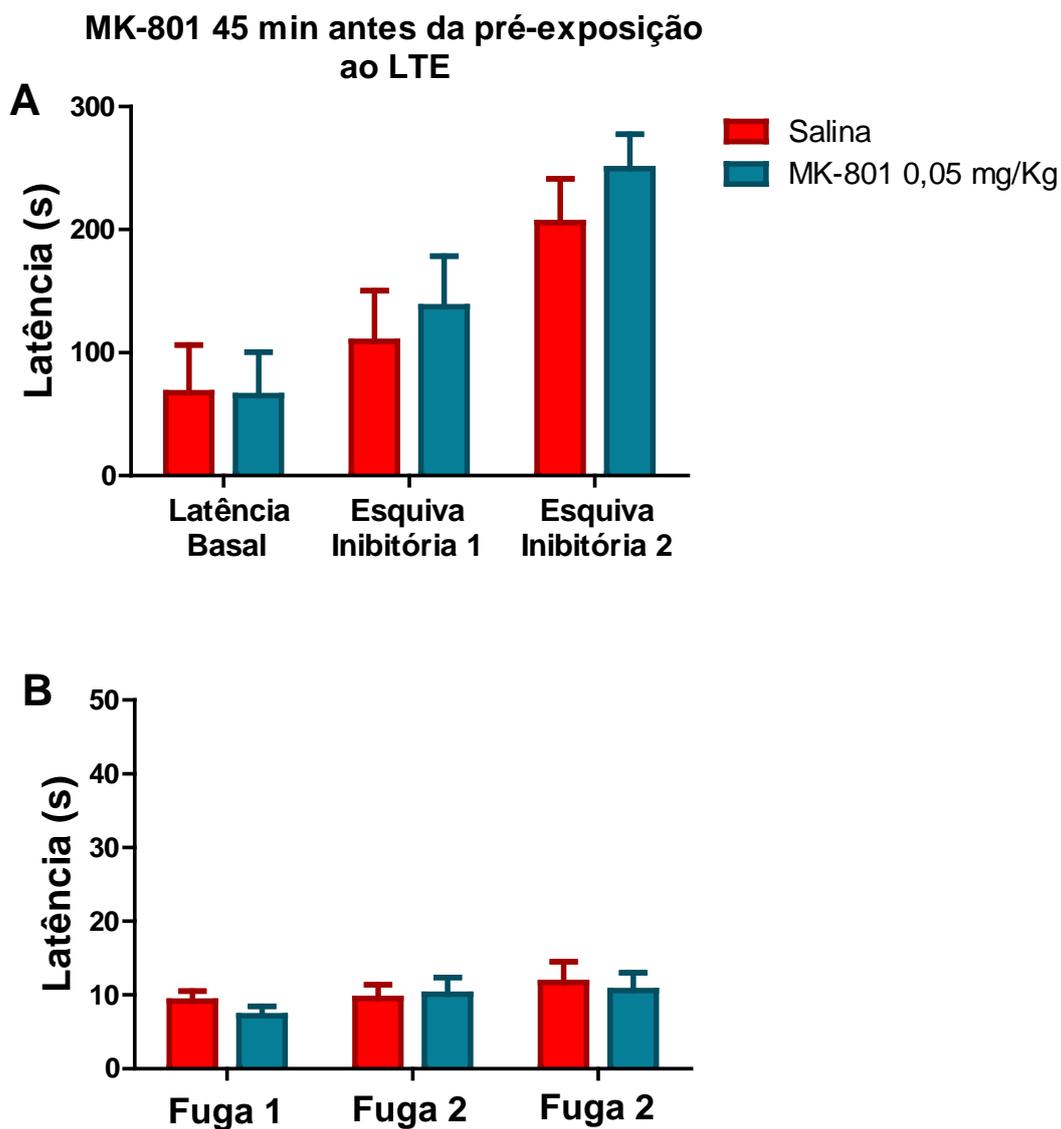


Figura 12. Latência na Esquiva Inibitória (A) e na Fuga (B) de ratos tratados por via intraperitoneal com salina (Grupo controle; n=10) ou MK-801 na dose de 0,05 mg/kg (n=11) 45 minutos antes da pré-exposição ao LTE e 24 horas antes do teste. Dados representam a Média \pm EPM.

A tabela 6 mostra que o tratamento com o MK-801 0,05 mg/kg não alterou a distância total percorrida pelo animal ($t_{(24)} = -1,406$; $p = 0,176$) quando comparado com grupos salina.

Tabela 6. Distância total percorrida de ratos tratados com salina (n=10) ou MK-801 na dose de 0,05 mg/kg (n=11) 45 minutos antes da pré-exposição, 24 horas antes do LTE e do campo aberto.

Tratamento	Distância Total (cm)
Salina	1662,7 ± 138,8
MK-801 0,05 mg/kg	1978,8 ± 173,1

Nota: Dados representam média ± EPM.

A Figura 13 mostra a fotomicrografia do sítio de injeção na MCPD, e a Figura 15 o diagrama com os sítios de injeção na estrutura. Os animais cujas agulhas estavam posicionadas na MCP dorsolateral e a MCP dorsomedial foram considerados. Os animais que tiveram a injeção fora dessas regiões foram excluídos da análise comportamental.

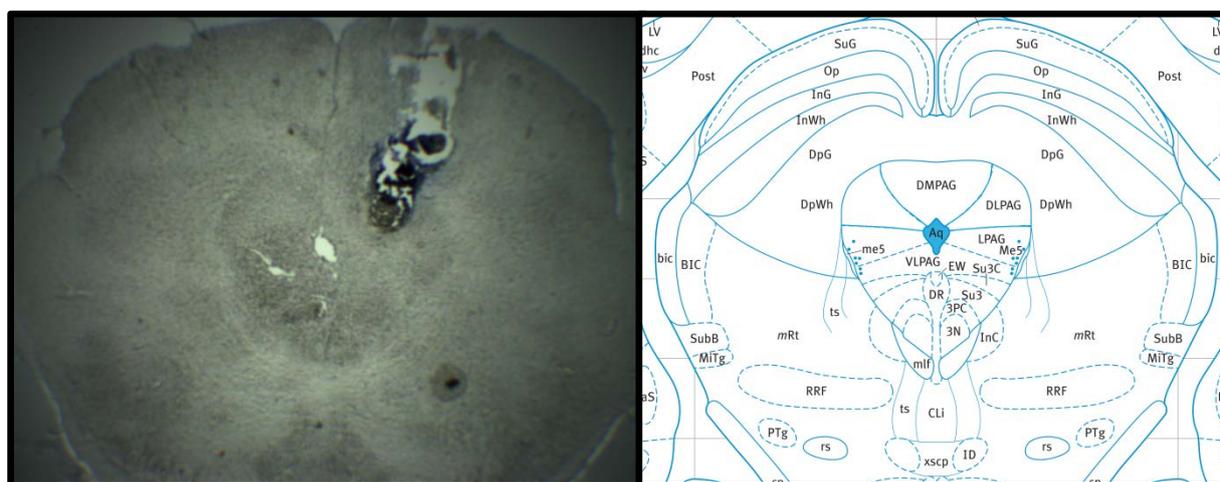


Figura 13. Fotomicrografia do sítio de injeção na MCPD. No lado esquerdo da figura está localizada a fotomicrografia de um sítio de injeção na MCPD, e à direita, está representado o plano relativo a essa região no Atlas de Paxinos e Watson (2009).

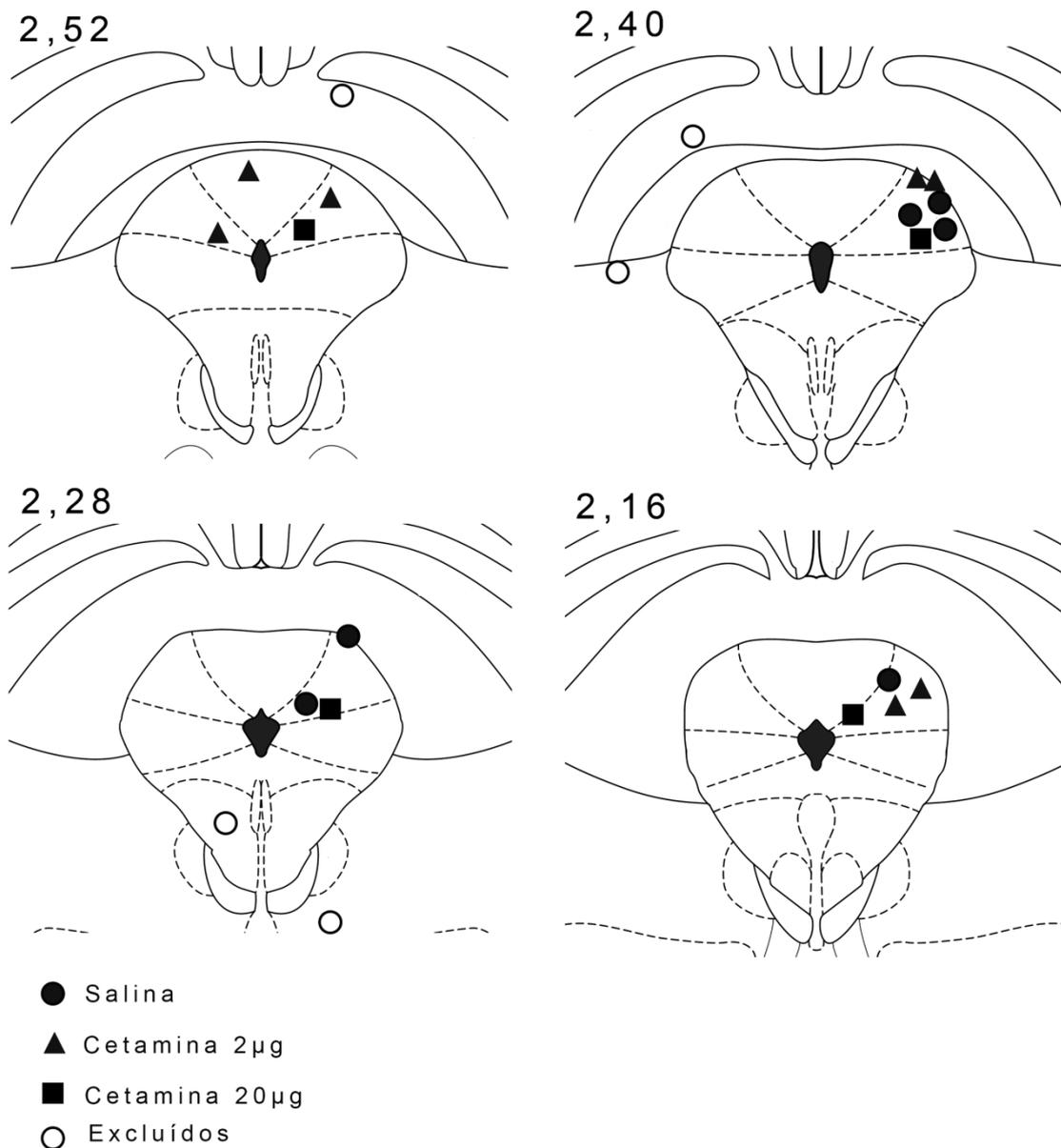


Figura 14. Representação do local dos sítios de injeção na MCPD (Interaural 2,52 a 2,16) de alguns dos animais utilizados no experimento da injeção intra-MCPD de cetamina antes do LTE. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número de animais submetidos ao experimento. As figuras apresentam as coordenadas das respectivas interaural com base no Atlas de Paxinos e Watson (Modificado de Paxinos, Watson, 2009).

A Figura 15 mostra os resultados da cetamina 2 e 20 µg/0,2µL 20 minutos antes do LTE. A análise de medida repetida revelou que a esQUIVA inibitória foi adquirida durante o teste ($F_{(1,22)} = 30,774$; $p < 0,0001$), e não mostrou efeito significativo do tratamento ($F_{(2,22)} = 0,068$; $p = 0,935$) e nem na interação

tratamento x esquiva ($F_{(2,22)} = 0,492$; $p = 0,618$). A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento afetou a latência da fuga 1 ($F_{(2,22)} = 3,531$; $p = 0,047$) e deixou inalteradas as outras tentativas (Fuga 2: $F_{(2, 24)} = 1,097$; $p = 0,352$; Fuga 3: $F_{(2, 24)} = 1,806$; $p = 0,188$). A análise post hoc revelou que a cetamina $2 \mu\text{g}$ facilitou a Fuga 1 quando comparado com o grupo controle (Teste de Dunnett, $p = 0,034$), sugerindo efeito tipo-panicogênico.

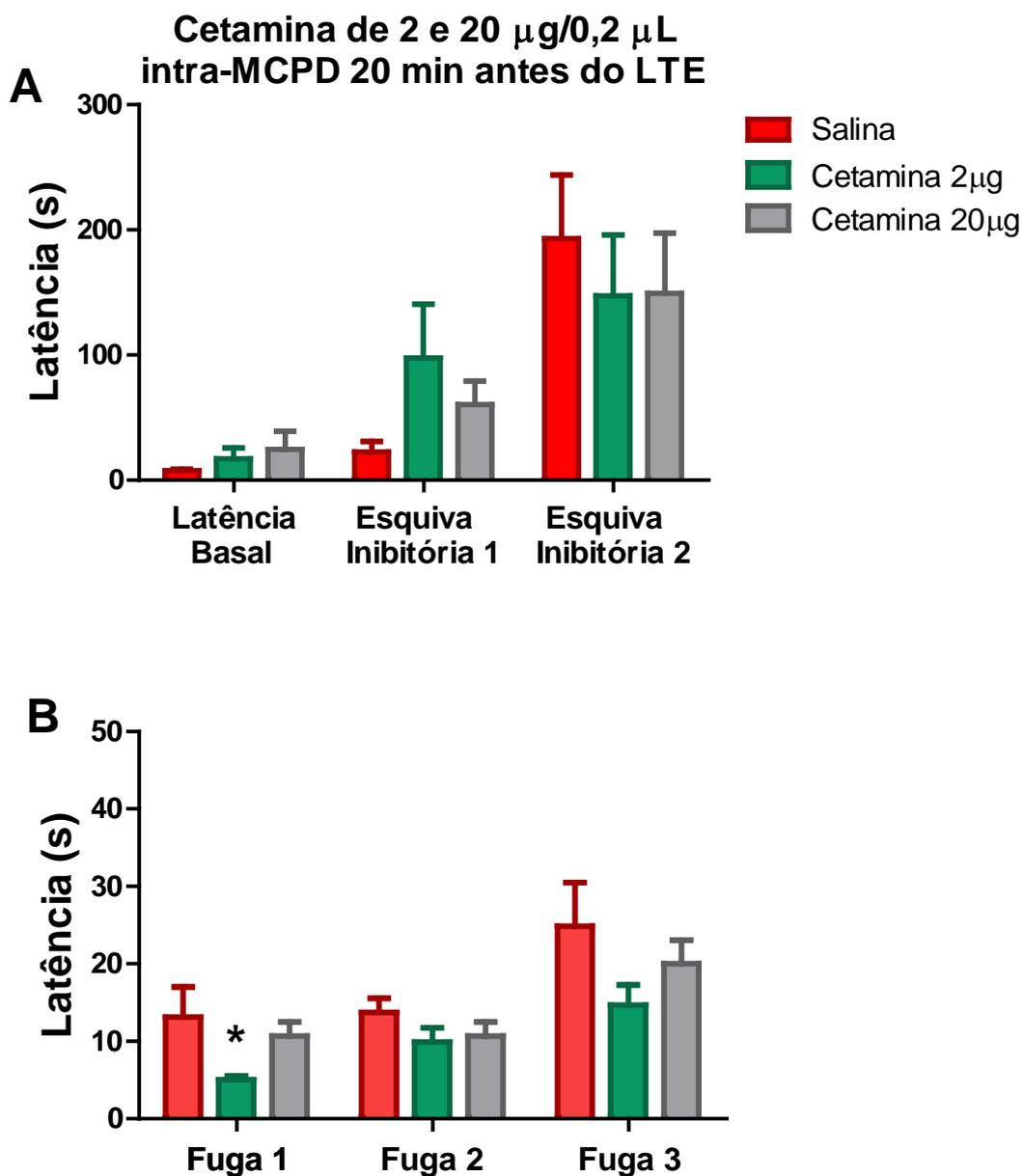


Figura 15. Latência na Esquiva Inibitória (A) e na Fuga (B) de ratos tratados por via intra-MCPD com salina (Grupo controle; $n=7$) ou Cetamina nas doses de 2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ($n=9$) e 20 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$ ($n=9$) 20 minutos antes do teste no LTE. Dados representam a Média \pm EPM.

A tabela 7 mostra que o tratamento com a cetamina (2 e 20 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{L}$) intra-MCPd não alterou a distância total percorrida pelos animais ($F_{(2,25)}= 2,738$; $p= 0,086$) quando comparado com o grupo salina.

Tabela 7. Distância total percorrida de ratos tratados com salina (n=8) ou Cetamina nas doses de 2 µg/0,2 µL (n=7) ou 20 µg/0,2 µL (n=11) por via intra-MCPd 20 minutos antes do teste no LTE e imediatamente após colocados no campo aberto.

Tratamento	Distância Total (cm)
Salina	1736,51 ± 201,85
Cetamina 2µg/0,2 µL	1623,34 ± 358,60
Cetamina 20 µg/0,2 µL	2317, 56 ± 168,16

Notas: ^aDados representam média ± EPM.

4.2. QUANTIFICAÇÃO DE TrkB TOTAL, pTrkB Y-706/707, pTrkB Y-515 NA MCP

Os resultados do tratamento com Cetamina 80 mg/kg 2 horas antes da coleta da MCP sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515 são mostrados na Figura 16. Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão de pTrkB Y-706/707 ($t_{(9)} = 0,5461$; $p = 0,5983$) e de pTrkB Y-515 ($t_{(9)} = 1,133$; $p = 0,2867$).

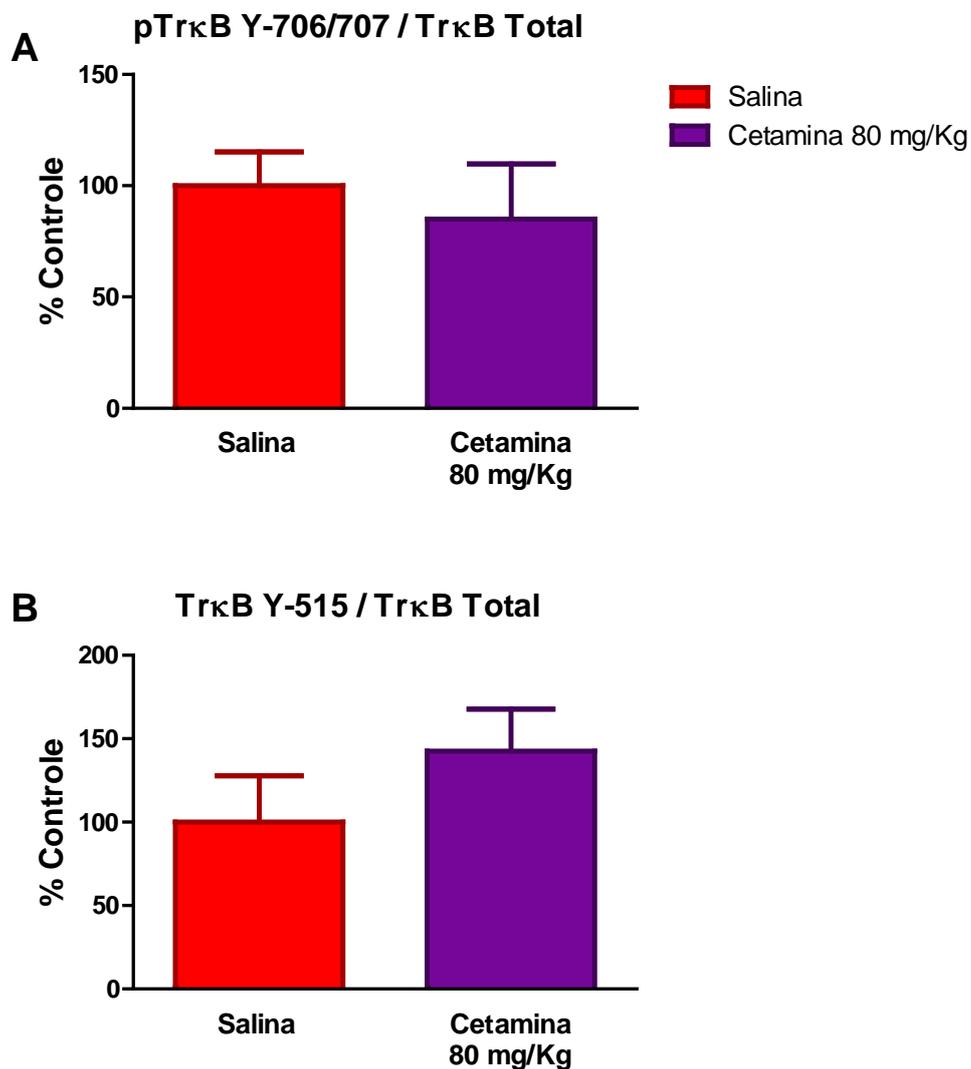


Figura 16. Efeito da administração de salina ou Cetamina 80 mg/kg sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 (A) e de pTrkB Y-515 (B) normalizadas pela expressão de TrkB total. As amostras da MCP foram coletadas 2 horas após a administração da droga. Para pTrkB Y-706/707, Salina, n=7; e Cetamina 80 mg/Kg, n= 4. Para pTrkB Y-515, Salina, n=5; e Cetamina 80 mg/kg, n= 6. Dados representam a Média \pm EPM.

A Figura 17 mostra os resultados do tratamento com MK-801 0,05 mg/kg 45 min antes da coleta da MCP sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515. Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão de pTrkB Y-706/707 ($t_{(9)} = 0,5461$; $p = 0,5983$) e de pTrkB Y-515 ($t_{(9)} = 1,133$; $p = 0,2867$).

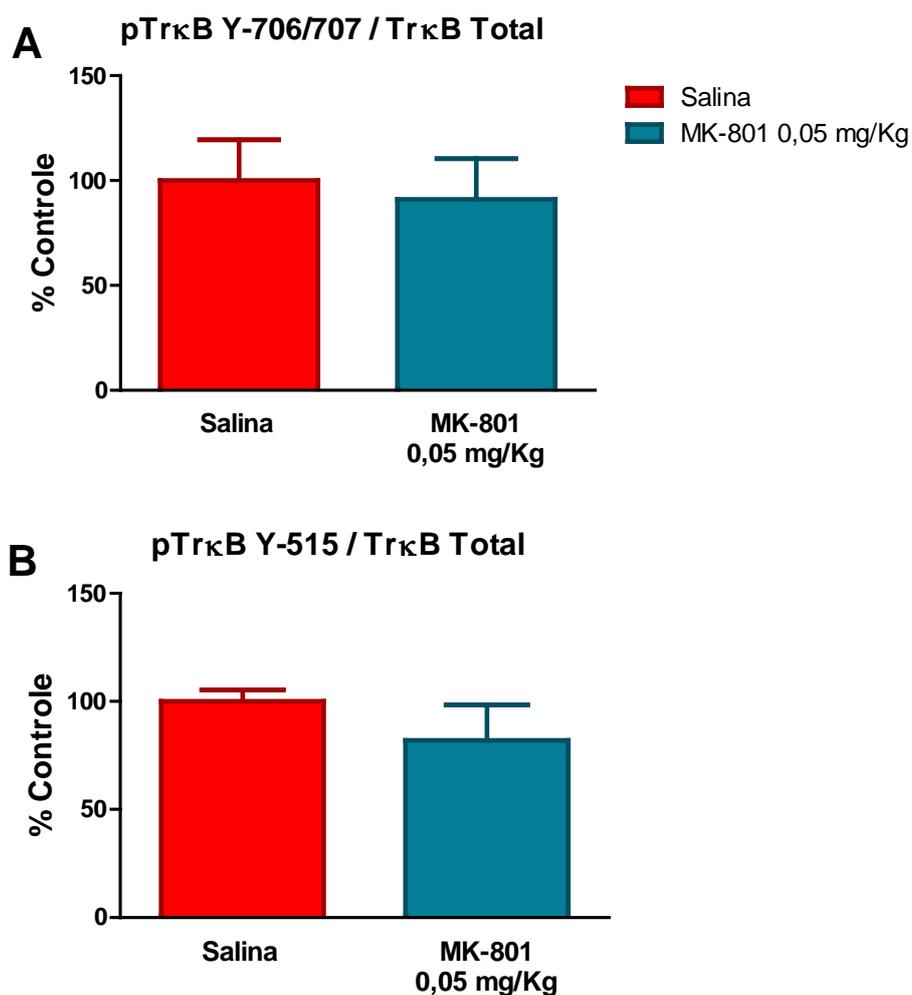


Figura 17. Efeito da administração de salina ou MK-801 0,05 mg/kg por via i.p. sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 (A) e de pTrkB Y-515 (B) normalizadas pela expressão de TrkB total. As amostras da MCP foram coletadas 45 minutos após a administração das drogas. Para pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515, Salina, n=5; e MK-801 0,05 mg/kg, n= 6. Dados representam a Média \pm EPM.

A Figura 18 mostra os resultados do tratamento com Cetamina 10 mg/kg 24 horas antes da coleta da MCP sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 e de pTrkB Y-515. Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão de pTrkB Y-706/707 ($t_{(9)} = 1,737$; $p = 0,1164$) e de pTrkB Y-515 ($t_{(9)} = 1,478$; $p = 0,1736$).

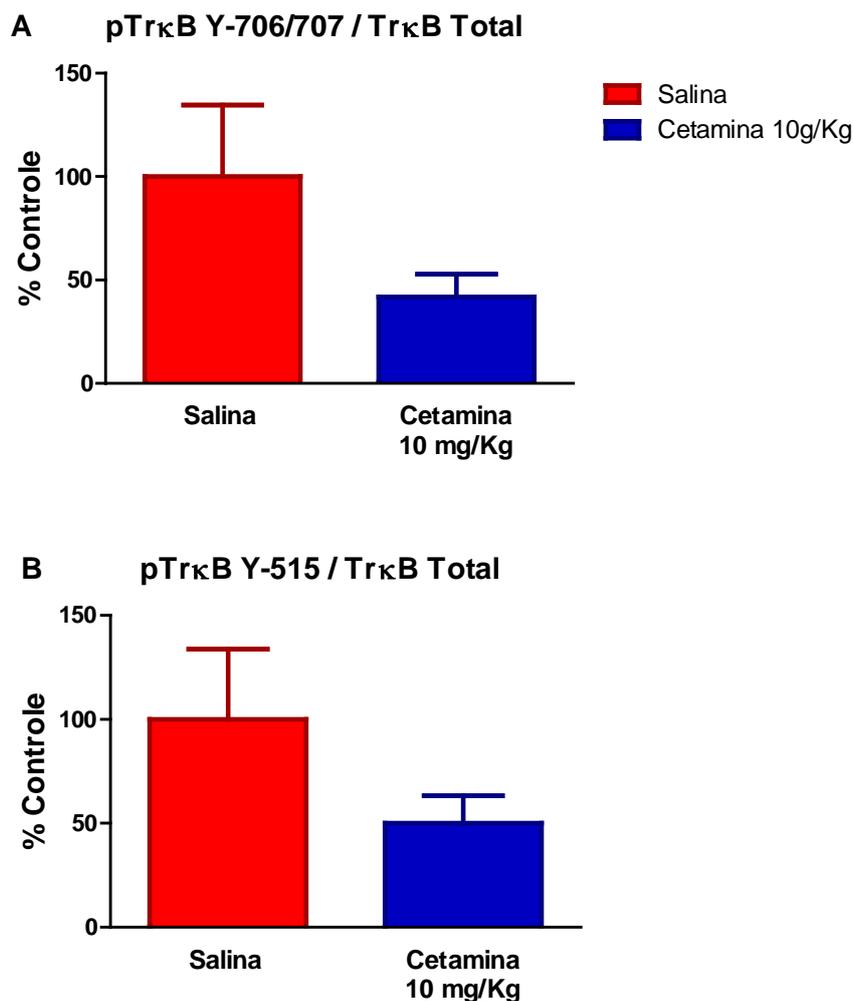


Figura 18. Efeito da administração de salina ou Cetamina 10 mg/kg por via i.p. sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 (A) e de pTrkB Y-515 (B) normalizadas pela expressão de TrkB total. As amostras da MCP foram coletadas 24 horas após a administração das drogas. Para pTrkB Y-706/707 e pTrkB Y-515, Salina, n=5; e Cetamina 10 mg/kg, n= 6. Dados representam a Média \pm EPM.

Os resultados do tratamento com cetamina 80 mg/kg 24 horas antes da coleta da MCP sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 e de pTrkB Y-515 são mostrados na Figura 19. Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão de pTrkB Y-706/707 ($t_{(9)} = 0,0687$; $p = 0,9465$) e de pTrkB Y-515 ($t_{(9)} = 0,5721$; $p = 0,5813$).

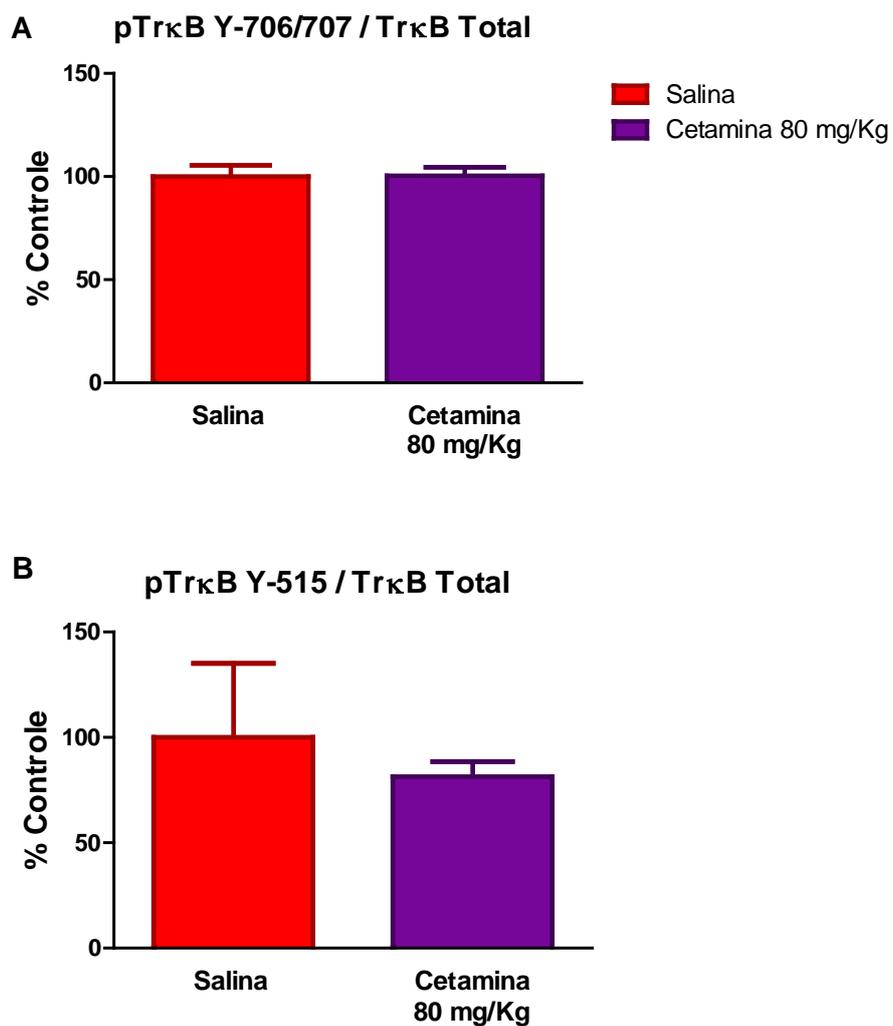


Figura 19. Efeito da administração de salina ou Cetamina 80 mg/kg por via i.p. sobre a expressão de pTrkB Y-706/707 (A) e de pTrkB Y-515 (B) normalizadas pela expressão de TrkB total. As amostras da MCP foram coletadas 24 horas após a administração das drogas. Para pTrkB Y-706/707, Salina, n=6; e Cetamina 80 mg/kg, n= 7; Para pTrkB Y-515, Salina, n=5; Cetamina 80 mg/kg, n=6. Dados representam a Média \pm EPM.

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que doses suabanestésicas da cetamina (10 e 30 mg/Kg), administradas de forma aguda, não alteraram o comportamento dos animais expostos ao LTE. Quando a menor dose de cetamina (10mg/Kg) foi administrada 24 horas antes do teste, houve facilitação da Fuga 1, o que pode sugerir um efeito tipo-panicogênico tardio. Já a administração aguda da dose anestésica (80mg/kg) prejudicou a fuga 1 no LTE, o que pode ser interpretado como efeito tipo-panicolítico rápido. E quando essa mesma dose foi administrada 24 horas antes do teste, facilitou esquiva inibitória, o que sugere um efeito tipo-ansio gênico tardio, e ao mesmo tempo, prejudicou a fuga 1, sugerindo um efeito tipo-panicolítico persistente. Já o MK-801 (0,05 mg/Kg), outro antagonista não-competitivo do receptor NMDA, administrado 24 horas antes do teste não alterou o comportamento dos animais. Ao administrar a cetamina diretamente na MCPD foi observado que apenas a dose mais baixa, de 2µg, facilitou a fuga 1, o que sugere efeito tipo-panicogênico rápido. Entretanto, os efeitos da cetamina no pânico, nos diferentes protocolos empregados, devem ser visto com cautela, já que a droga alterou somente a fuga 1 do LTE.

Nossos resultados mostraram que a administração aguda da dose anestésica de cetamina (80 mg/Kg) prejudicou a fuga 1 no LTE, o que sugere um efeito do tipo-panicolítico rápido dessa dose. Estudos mostraram que a injeção de AP7 (ácido 2-amino-7 fosfonoheptanóico) um antagonista seletivo do receptor NMDA, intracerebroventricular (BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006) ou intra-MCP dorsolateral (MCPDL; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009) induziu efeito tipo-panicolítico no teste de exposição ao predador. Por outro lado, a administração de NMDA intra-MCPD induziu respostas de fuga nos animais, o que pode ser interpretado como efeito tipo-panicogênico (BITTENCOURT et al., 2004).

É possível que a via de sinalização do óxido nítrico (NO) esteja envolvida nesse efeito panicolítico da cetamina. Nesse sentido, Liebenberg e colaboradores (2014) mostraram que o efeito tipo-antidepressivo da cetamina é bloqueado pela administração prévia de L-arginina (precursor de NO). Outro estudo mostrou efeito tipo-antidepressivo da associação metil éster de L-NG-

nitroarginina (L-NAME; inibidor não seletivo de NOS) com dose subefetiva de cetamina (ZHANG et al., 2013). Evidências sugerem que o bloqueio do receptor NMDA na MCPD inibe a formação de NO, por consequência, induz efeito tipo-panicolítico de forma aguda em modelos de ansiedade. Por exemplo, a injeção prévia de um antagonista do receptor NMDA, o AP7, preveniu completamente os efeitos do SIN-1 (doador de NO) nas respostas defensivas (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004). A administração de doadores do NO (SIN-1, cloreto de 3-morfolinossilnomina; e DEA/NO, dietilamina do óxido nítrico) intra-MCPDL provocaram respostas de fuga na arena circular (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000). Já a administração do inibidor de guanilato ciclase solúvel (azul de metileno) induziu efeito tipo-ansiolítico em animais expostos ao LCE (DE-OLIVEIRA; GUIMARÃES, 1999).

Nossos resultados ainda mostraram que tanto a dose anestésica quanto as doses subanestésicas de cetamina, administrada de forma aguda, não alteraram de forma estatisticamente significativa o comportamento na esQUIVA inibitória. Outros estudos mostram a ausência de efeito da cetamina em diferentes modelos de ansiedade, como no teste de *holeboard* (SILVESTRE et al., 1997), no LCE (CARRIER; KABBAJ, 2013; DA SILVA et al., 2010; ENGIN; TREIT; DICKSON, 2009; ZHANG et al., 2015b), no teste de transição claro-escuro (CARRIER; KABBAJ, 2013) e no tempo de congelamento (ZHANG et al., 2015).

A ausência do efeito da dose anestésica talvez possa ser justificada, também, pela perda da especificidade do alvo de ação da droga. Nesse sentido, foi descrito que quando a concentração de cetamina está baixa, ela exerce sua ação através da interação com sítio de ligação da fenciclidina (PCP; ØYE et al., 1991). Com o aumento na sua concentração, a cetamina passa a interagir com receptores opióides do tipo μ (ØYE et al., 1991), suprimir canais de sódio (FRENKEL; URBAN, 1992) e afetar canais de membrana operados por voltagem (ANNETTA et al., 2005). Portanto, a ativação de diferentes alvos moleculares poderia eliciar efeitos contrários que se anulariam entre si na observação do comportamento no LTE.

Quando a administração da dose subanestésica de cetamina (10mg/Kg) foi realizada 24 horas antes do teste no LTE, houve facilitação da Fuga 1, o que pode sugerir um efeito tipo-panicogênico tardio. Os resultados também mostraram que a dose anestésica da cetamina administrada 24 horas antes do LTE facilitou à esquivas, o que sugere um efeito tipo-ansiolítico tardio, e ao mesmo tempo prejudicou a fuga 1, sugerindo um efeito tipo-panicolítico persistente.

Por outro lado, resultados prévios do laboratório evidenciaram que outro antagonista NMDA, o MK-801, administrado agudamente, induziu somente efeito tipo-ansiolítico em ratos expostos ao LTE, ou seja, não alterou a resposta de fuga (SILOTE, 2013). E ainda, no presente estudo se verificou que o MK-801 na dose de 0,05 mg/Kg não provocou nenhuma alteração comportamental em ratos testados no LTE aproximadamente 24 horas após a injeção. A ausência de resultado tardio ou persistente também foi evidenciado no teste do nado forçado (AUTRY et al., 2012).

É provável que outros mecanismos além do simples bloqueio do receptor NMDA estejam envolvidos no efeito panicolítico da cetamina. Uma possibilidade é de que a via de sinalização de BDNF esteja envolvida, já que a ativação dessa via parece ser importante para mediar o efeito antidepressivo da cetamina em animais (AUTRY et al, 2012) e em seres humanos (HAILE et al., 2014).

Alguns estudos apoiam o envolvimento do BDNF também na ansiedade. Por exemplo, camundongos nocaute para BDNF que apresentaram redução da quantidade dessa neurotrofina no lisado de cérebro, apresentaram efeito tipo-ansiolítico no LCE e no teste de campo aberto (CHEN et al., 2006). Govindarajan et al. (2006) também mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam BDNF apresentaram, ao mesmo tempo, níveis aumentados dessa neurotrofina na amígdala basolateral (ABL) e comportamento ansiolítico no LCE e no campo aberto. Ainda, Casarotto et al. (2012) evidenciaram efeito ansiolítico da injeção de BDNF intra-hipocampo dorsal no LTE e no teste de transição claro-escuro. E finalmente, foi observado redução dos níveis plasmáticos de BDNF em pacientes com TAG (WANG et al., 2015).

Dessa forma, o efeito ansiogênico observado 24 horas após a administração da dose anestésica de cetamina poderia ser decorrente de um aumento agudo na liberação de BDNF em áreas como a amígdala e o hipocampo.

O BDNF também parece estar associado com o TP. Nesse sentido, pacientes com TP que respondem a terapia cognitiva-comportamental apresentam níveis mais elevados de BDNF plasmático quando comparados aos indivíduos que respondem mal a essa terapia (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Outro estudo mostrou uma associação entre três SNP do gene do BDNF com a susceptibilidade para desenvolvimento de TP (HAN *et al.*, 2015). Casarotto *et al.* (2010) mostraram que a injeção intra-MCPD de BDNF produziu efeito tipo-panicolítico em ratos testados na estimulação elétrica da MCPD, que foi revertido pela administração prévia do K252a, o inibidor de Trk. Portanto, é possível que o efeito tipo-panicolítico agudo e persistente da dose anestésica de cetamina envolva o aumento de BDNF em estruturas como a MCPD. Ao mesmo tempo, a dose subanestésica poderia bloquear receptores NMDA pós-sinápticos, o que impediria o influxo de Ca^{2+} , e conseqüentemente, reduziria a liberação de BDNF nessa mesma estrutura, justificando, portanto, o efeito panicogênico tardio.

Vale ressaltar que a cetamina apresenta meia-vida plasmática curta, de aproximadamente 2 a 3 horas (CLEMENTS; NIMMO; GRANT, 1982). Logo, é possível que os seus efeitos persistentes e tardios observados na ansiedade ocorram independentes do bloqueio persistente do receptor NMDA. Eles podem ocorrer devido à indução da sinaptogênese (LI *et al.*, 2010) ou ainda pela produção dos metabólitos ativos, a norcetamina e hidroxinorcetamina (PAUL *et al.*, 2014), como foi observado para o efeito antidepressivo persistente da cetamina.

Para investigar o envolvimento da via de sinalização de BDNF/TrkB nos efeitos da cetamina e do MK-801 na ansiedade no LTE, realizamos a quantificação de TrkB total e fosforilado nos resíduos Y-706/707 e Y-515 da MCP de ratos. Nossos resultados mostraram que a cetamina (80mg/Kg), administrada 2 horas antes da coleta da MCP, não induziu alteração estatisticamente significativa na quantidade de pTrkB nos resíduos Y-706/707 e Y-515. Entretanto, parece

haver um aumento especificamente da proporção de fosforilação do resíduo Y-515, que talvez possa ser estatisticamente significativa com o aumento do tamanho amostral. Caso esse aumento se confirme, pode haver a participação especificamente das vias de Ras/MAPK e IP3K, recrutadas quando esse resíduo é fosforilado, no efeito tipo-panicolítico da cetamina observado no LTE. Esse possível resultado está de acordo com o que foi observado para o efeito antidepressivo da estimulação do nervo vago (ENV), que aumentou a proporção de fosforilação dos resíduos Y-705, Y-515 e Y-816, de forma aguda no hipocampo (FURMAGA; CARRENO; FRAZER, 2012). Além disso, o efeito tipo-antidepressivo da cetamina parece envolver a ativação de m-TOR, de 4E-BP1 e de P70S6K, moléculas recrutadas quando as vias de Ras/MAPK e PI3K são ativadas (LI et al., 2010).

Já a ausência de diferença estatística significativa para o resíduo Y-706/707 do TrkB pode ser devida a baixa especificidade do anticorpo utilizado na análise. Esse anticorpo detecta, além da fosforilação no TrkB no resíduo Y-706/707, a fosforilação no TrkA Y-674/675. Ainda, ele pode apresentar reação cruzada com proteína de peso molecular aproximadamente de 150 kDa em resíduo de tirosina desconhecido. (Cell Signalling Technology, Acesso em 10 mar. 2016).

O MK-801 0,05mg/Kg, administrado 45 minutos antes da coleta, não induziu nenhuma alteração estatisticamente significativa na quantidade de pTrkB em ambos resíduos de fosforilação. Esse resultado apoiou nossa hipótese inicial de que o efeito tipo-ansiolítico dessa droga no LTE não seria decorrente da ativação da via BDNF/TrkB na MCP.

Nosso estudo ainda mostrou que a cetamina 10mg/Kg, administrada aproximadamente 24 horas antes da coleta da MCP, não induziu alteração estatisticamente significativa na quantidade de pTrkB no resíduo Y-706/707 e Y-515. Entretanto, parece haver uma redução da proporção de fosforilação do resíduo Y-706/707 e do Y-515, que talvez possa ser confirmada com o aumento do tamanho amostral. Essa diminuição na ativação da via BDNF/TrkB explicaria o efeito tipo-panicogênico da dose subanestésica de cetamina observado no LTE.

A dose anestésica de cetamina, administrada aproximadamente 24 horas antes da coleta, não induziu alteração estatisticamente significativa na quantidade de pTrkB nos resíduos Y-706/707 e Y-515. Os resultados encontrados estão de acordo com estudo de Autry et al. (2012), no qual a cetamina não alterou a expressão de BDNF no hipocampo 24 horas após o tratamento. Diante disso, sugere-se que a via de BDNF/TrkB não é importante para mediar as respostas comportamentais de 24 horas da dose anestésica da cetamina na MCP.

Estudos adicionais serão necessários para investigar se pode haver o envolvimento de outro resíduo de fosforilação do receptor TrkB, o Y-816, nos efeitos comportamentais encontrados pela cetamina no LTE. E também, investigar se a via de BDNF/TrkB é importante para os efeitos da cetamina em outras estruturas envolvidas com ansiedade, tais como a amígdala e córtex pré-frontal.

Uma limitação do presente trabalho que não deve deixar de ser mencionada é que foi empregada a detecção colorimétrica para avaliar a quantidade de proteína na membrana de WB. Esse tipo de detecção apresenta certas limitações, tais como baixa sensibilidade; a cor formada não poder ser modificada (intensificada ou reduzida) para facilitar a análise; e poder ocorrer ligação inespecífica com os anticorpos conjugados à enzima, o que dificulta a quantificação das proteínas (STOTT, 1989). Para melhorar a sensibilidade dos resultados, seria interessante utilizar o método de detecção por quimioluminescência, que apresentam as seguintes vantagens, alta sensibilidade, a técnica é confiável entre os laboratórios e redução da marcação inespecífica (POH; WEE; GAO, 2016).

Apesar de não termos observado alteração da quantidade de pTrkB na MCP de ratos tratados com cetamina, não podemos descartar que os efeitos panicogênico e panicolítico da cetamina fossem mediados pela MCPD. Para avaliar essa possibilidade, administrou-se a cetamina (2 ou 20µg/0,2 µL) diretamente nessa estrutura cerebral. Observou-se que apenas a dose mais baixa, de 2µg, facilitou a fuga 1, o que caracteriza um efeito tipo-panicogênico rápido. Por se tratar de injeção intracerebral, fica difícil determinar se essa dose equivale a dose subanestésica ou anestésica. Contudo, de acordo com o

resultado observado pode-se inferir que essa dose tenha o mecanismo de ação semelhante ao da dose subanestésica. Como a administração de doses subanestésicas de cetamina aumenta os níveis de glutamato no córtex pré-frontal (CPF) (MOGHADDAM et al., 1997), o mesmo poderia ocorrer na MCPD. Esse neurotransmissor poderia agir, então em receptor AMPA nessa estrutura (ALBIN et al., 1990), produzindo o efeito panicogênico da cetamina.

Talvez a dose de 20 µg de cetamina intra-MCPD não tenha sido suficiente para induzir o efeito panicolítico. Nesse sentido, a administração de cetamina sistêmica aumentou a latência no teste de retirada da cauda, teste que afere o grau de analgesia, já a administração intra-MCP não produziu nenhuma alteração no mesmo teste (SMITH et al., 1985).

Como a maior parte dos efeitos da cetamina no LTE foram observados com a dose anestésica, não podemos descartar, ainda, a possibilidade de interação dessa droga com outros receptores, como por exemplo, os receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, os adrenérgicos e os opióides, (KOHRS; DURIEUX, 1998). É possível que os opióides endógenos possam mediar os efeitos comportamentais observados com a cetamina no LTE. O tratamento prévio com tramadol (agonista fraco não seletivo de receptor opióide) potencializou o efeito tipo-antidepressivo da cetamina no TNF, e essa associação aumentou a expressão de TrkB e BDNF no hipocampo (YANG et al., 2012). Além do mais, a administração intravenosa e intra-MCPD de opiorfina (inibidor da endopeptidases neutras e aminopeptidase N - enzimas responsáveis pela degradação de encefalinas endógenas) induziu efeito panicolítico no LTE e na estimulação elétrica da MCPD mediado por receptor opióide do tipo μ (MARASCHIN et al., 2016). Ainda, a cetamina pode atuar em receptores opióides do tipo sigma (σ ; SMITH et al., 1987) e provocar a excitação do SNC e os seus efeitos disfóricos (ANNETTA et al., 2005), o que pode produzir aumento na ansiedade.

Por fim, como a avaliação do comportamento no LTE é dependente da atividade exploratória dos animais, de forma que qualquer alteração na exploração poderia limitar a interpretação dos resultados neste teste, foi avaliado se o tratamento com cetamina nos diferentes protocolos experimentais

interfere na atividade locomotora do animal. Nenhum dos esquemas de tratamento alteraram a atividade locomotora dos animais no campo aberto, o que mostra que os efeitos encontrados correspondem aos efeitos da droga na ansiedade, e não uma alteração na locomoção do animal.

6. CONCLUSÕES

Em resumo, os resultados mostraram que a cetamina (10 e 30 mg/Kg) administrada de forma aguda não alterou o comportamento dos ratos no LTE. Já a dose anestésica, prejudicou a fuga 1, o que sugere efeito tipo-panicolítico rápido. Quando a dose subanestésica de cetamina (10mg/Kg) foi administrada 24 horas antes do teste no LTE, facilitou a fuga 1, que é interpretado como efeito tipo-panicogênico tardio. Os resultados também mostraram que a dose anestésica da cetamina, administrada 24 horas antes do LTE, facilitou a latência basal e a esquiva inibitória 1, o que sugere tipo-ansio-gênico tardio, e prejudicou a fuga 1, produzindo efeito tipo-panicolítico persistente. E o MK-801 (0,05 mg/Kg) administrado 24 horas antes do teste não alterou o comportamento dos animais. Quando a cetamina foi administrada diretamente na MCPD observou-se que apenas a dose mais baixa, de 2µg, facilitou a fuga 1, caracteriza um efeito tipo-panicogênico rápido. Nenhum dos esquemas de tratamento empregados alteraram a atividade locomotora dos animais no campo aberto.

Em conclusão, os resultados encontrados mostram que a cetamina pode ter um efeito muito discreto no pânico, sendo que esse efeito depende tanto da dose quanto do esquema de administração. Ainda, pelo menos o efeito panicogênico da cetamina parece envolver a MCPD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 2418–2429, 2009.
- ALBIN, R. L. et al. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience letters**, v. 118, p. 112–5, 1990.
- ANNETTA, M. G. et al. Ketamine: new indications for an old drug. **Current drug targets**, v. 6, p. 789–794, 2005.
- AUTRY, A. E. et al. Gender-Specific Impact of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling on Stress-Induced Depression-Like Behavior. **BPS**, v. 66, n. 1, p. 84–90, 2009.
- AUTRY, A. E. et al. NMDA Receptor Blockade at Rest Triggers Rapid Behavioural Antidepressant Responses. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 91–95, 2012.
- BABAR, E. et al. Effects of ketamine on different types of anxiety/fear and related memory in rats with lesions of the median raphe nucleus. **European journal of pharmacology**, v. 431, n. 3, p. 315–20, 2001.
- BARDE, Y.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO**, v. 1, n. 5, p. 549–553, 1982.
- BARRIA, A.; MALINOW, R. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. **Neuron**, v. 35, n. 2, p. 345–53, 2002.
- BARRIENTOS, R. . et al. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 847–853, 2003.
- BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. Effects of Hypericum perforatum and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 2, p. 199–207, 2003.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behavioural brain research**, v. 170, n. 1, p. 52–61, 2006.
- BERGAMI, M. et al. Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 40, p. 15570–5, 2008.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J. G. M.; WESTENBERG, H. G. M. Glutamate and anxiety. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 175–83, 2004.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351–4, 2000.

BERMUDO-SORIANO, C. R. et al. New perspectives in glutamate and anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 4, p. 752–74, 2012.

BITTENCOURT, A S. et al. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71–89, 2004.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; HOLMES, A. Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 2405–2414, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDÃO, M. L.; FONTES, J. C. S.; GRAEFF, F. G. Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 13, p. 1–4, 1980.

CARRIER, N.; KABBAJ, M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 27–34, 2013.

CASAROTTO, P. C. et al. Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 13, n. 5, p. 573–82, 2010.

CASAROTTO, P. C. et al. BDNF-TRKB signaling system of the dorsal periaqueductal gray matter is implicated in the panicolytic-like effect of antidepressant drugs. **European Neuropsychopharmacology**, p. 1–10, 2015.

CASAROTTO, P. C.; DE BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, p. 80–88, 2012.

CHEN, B. et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260–5, 2001.

CHEN, Z. et al. Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety-Related Behavior. **Science**, v. 314, n. 5796, p. 140–143, 2006.

CLEMENTS, J. A.; NIMMO, W. S.; GRANT, I. S. Bioavailability, pharmacokinetics, and analgesic activity of ketamine in humans. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 71, n. 5, p. 539–542, 1982.

COLLINGRIDGE, G. L.; BLISS, T. V. P. Memories of NMDA receptors and LTP. **Trends in neurosciences**, v. 18, p. 54–56, 1995.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory? **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 3, n. February, p. 1–14, 2010.

DA SILVA, F. C. C. et al. Behavioral alterations and pro-oxidant effect of a single ketamine administration to mice. **Brain Research Bulletin**, v. 83, p. 9–15, 2010.

DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain research bulletin**, v. 51, n. 6, p. 457–464, 2000.

DE-OLIVEIRA, R. W.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1529–1532, 1999.

DIAZGRANADOS, N. et al. A Randomized Add-on Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Bipolar Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 8, p. 793–802, 2010.

DU, J. et al. Enhancing AMPA to NMDA throughput as a convergent mechanism for antidepressant action. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, n. 4, p. 519–526, 2006.

DUMAN, R. S. et al. Signaling Pathways Underlying the Rapid Antidepressant Actions of Ketamine. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 35–41, 2012.

DWIVEDI, Y. et al. Altered Gene Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Receptor Tyrosine Kinase B in Postmortem Brain of Suicide Subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, p. 804–813, 2003.

ENGIN, E.; TREIT, D.; DICKSON, C. T. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. **Neuroscience**, v. 161, n. 2, p. 359–69, 2009.

ERNST, C. et al. A deletion in tropomyosin-related kinase B and the development of human anxiety. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 6, p. 604–7, 2011.

FRENKEL, C.; URBAN, B. W. Molecular actions of racemic ketamine on human CNS sodium channels. **British journal of anaesthesia**, v. 69, p. 292–7, 1992.

FURMAGA, H.; CARRENO, F. R.; FRAZER, A. Vagal Nerve Stimulation Rapidly Activates Brain-Derived Neurotrophic Factor Receptor TrkB in Rat Brain. **PLoS one**, v. 7, n. 5, 2012.

GARCIA, L. S. B. et al. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140–4, 2008.

GHASEMI, M.; RAZA, M.; DEHPOUR, A R. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 24, n. 4, p. 585–94, abr. 2010.

GOEBEL, D. J.; POOSCH, M. S. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: A quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1(Com), NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. **Molecular Brain Research**, v. 69, p. 164–170, 1999.

GOVINDARAJAN, A. et al. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p. 13208–13, 2006.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–46, 1998.

HAILE, C. N. et al. Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 331–336, 2014.

HAN, E. et al. Evidence for Association between the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and Panic Disorder : A Novel Haplotype Analysis. **Psychiatry Investigation**, v. 12, n. 1, p. 112–117, 2015.

HARVEY, B. H.; SHAHID, M. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 4, p. 775–800, 2012.

HASHIMOTO, K. A BDNF Val66Met Polymorphism and Ketamine-induced Rapid Antidepressant Action. **Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 59–60, 2012.

HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 2, p. 67–75, 2010.

HOFER, M. et al. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. **The EMBO**, v. 9, n. 8, p. 2459–2464, 1990.

HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11496–11500, 2007.

JANSEN, K. L. R. A review of the nonmedical use of ketamine: Use, users and consequences. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 32, p. 419–433, 2000.

JICK, H.; KAYE, J. A.; JICK, S. S. Antidepressants and the risk of suicidal behaviors. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 292, n. 3, p. 338–43, 2004.

JOURDI, H. et al. Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 27, p. 8688–8697, 2009.

KARCZ-KUBICHA, M. et al. Anxiolytic activity of glycine-B antagonists and partial agonists--no relation to intrinsic activity in the patch clamp. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 10, p. 1355–67, 1997.

KAREGE, F. et al. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain research. Molecular brain research**, v. 136, n. 1-2, p. 29–37, 2005a.

KAREGE, F. et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 1068–72, 2005b.

KEW, J. N. C.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 1, p. 4–29, 2005.

KLECKNER, N. W.; DINGLELINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. June, p. 835–837, 1988.

KLEIN, R. et al. The trkB Tyrosine Protein Kinase Is a Receptor for Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 395–403, 1991.

KOBAYASHI, K. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with panic disorder: As a biological predictor of response to group cognitive behavioral therapy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, p. 658–663, 2005.

KOHR, R.; DURIEUX, M. E. Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks. **Anesthesia and Analgesia**, v. 87, n. 5, p. 1186–1193, 1998.

KOIKE, H. et al. Role of BDNF/TrkB signaling in antidepressant-like effects of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist in animal models of depression. **Behavioural brain research**, v. 238, p. 48–52, 2013.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; CHAKI, S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. **Behavioural brain research**, v. 224, n. 1, p. 107–111, 2011.

KURYATOV, A.; LAUBE, B. Mutational Analysis of the Glycine Binding Site of the NMDA Receptor: Structural Similarity with Bacterial Amino Acid-Binding Proteins. **Cell**, v. 12, p. 1291–1300, 1994.

LAUTERBORN, J. C. et al. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 8–21, 2000.

LEIBROCK, J. et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. **Letters to Nature**, v. 341, p. 149–152, 1989.

LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959–964, 2010.

LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754–61, 2011.

LISSIN, D. V et al. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7097–102, 1998.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. **Pharmacology & therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 143–50, 2009.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 4, p. 678–87, 2012.

MACQUEEN, G. M. et al. Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. **Behavioral neuroscience**, v. 115, n. 5, p. 1145–53, 2001.

MAENG, S. et al. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biological psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349–52, 2008.

MAJ, J. NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs. **Pharmacological Research**, v. 25, p. i–i, 1992.

MARASCHIN, J. C. et al. Opiorphin causes a panicolytic-like effect in rat panic models mediated by μ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 101, p. 264–270, 2016.

MAXWELL, C. R. et al. Ketamine Produces Lasting Disruptions in Encoding of Sensory Stimuli. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 315–324, 2006.

MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L.; GUTHRIE, P. B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**, v. 309, p. 261–263, 1984.

MINICHIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 850–860, 2009.

MOGHADDAM, B. et al. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 2921–7, 1997.

MONTAG, C. et al. The BDNF Val66Met polymorphism and anxiety: support for animal knock-in studies from a genetic association study in humans. **Psychiatry research**, v. 179, n. 1, p. 86–90, 2010.

MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARÃES, F. S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 171, p. 199–203, 2004.

NASH, J. R.; NUTT, D. J. Pharmacotherapy of anxiety. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 169, p. 469–501, 2005.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7539–47, 1995.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of Glutamate Neurotransmission in Nervous System. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 656–664, 2013.

- ØYE, I. et al. The chiral forms of ketamine as probes for NMDA receptor function in humans. **NMDA receptor related agents: Biochemistry, Pharmacology, and Behaviour**, n. JANUARY, p. 381 – 389, 1991.
- PANCONI, E. et al. MK-801 and enantiomers: potential antidepressants or false positives in classical screening models? **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 46, n. 1, p. 15–20, 1993.
- PARK, H.; POO, M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 7–23, 2013.
- PAUL, R. K. et al. (R,S)-Ketamine Metabolites (R,S)-norketamine and (2S,S)-Hydroxynorketamine Increase the Target of Rapamycin Function. **Anesthesiology**, v. 121, n. 1, p. 149–159, 2014.
- PIETERSEN, C. Y. et al. Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 30, n. 7, p. 1209–18, 2006.
- POBBE, R. L. H. et al. Influence of procedural variables on rat inhibitory avoidance and escape behaviors generated by the elevated T-maze. **Behavioural brain research**, v. 273C, p. 45–51, 2014.
- POH, W. J.; WEE, C. P. P.; GAO, Z. DNA Methyltransferase Activity Assays: Advances and Challenges. **Theranostics**, v. 6, n. 3, p. 369–391, 2016.
- POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185–192, 2003.
- RANTAMÄKI, T. et al. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 2152–2162, 2007.
- REZNIKOV, L. R. et al. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 3109–14, 2007.
- ROCERI, M. et al. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. **Biological psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 708–14, 2004.
- SAARELAINEN, T. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 349–57, 2003.

- SANACORA, G. et al. Targeting the glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 426–437, 2008.
- SCHENBERG, L. C. et al. Modeling panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 2001, p. 647–659, 2001.
- SILOTE, G. P. **Investigação dos efeitos comportamentais da ketamina em ratos expostos ao labirinto em T elevado: Estudo comparativo com outro antagonista NMDA, o MK-801.** [s.l: s.n.].
- SILOTE, G. P. et al. Infusion of galanin into the mid-caudal portion of the dorsal raphe nucleus has an anxiolytic effect on rats in the elevated T-maze. **Behavioural brain research**, v. 252, p. 312–7, 2013.
- SILVESTRE, J. S. et al. Acute Effects of Ketamine in the Holeboard, the Elevated-Plus Maze, and the Social Interaction Test in Wistar Rats. **Depression and Anxiety**1, v. 5, p. 29–33, 1997.
- SMITH, D. J. et al. Ketamine analgesia is not related to an opiate action in the periaqueductal gray region of the rat brain. **Pain**, v. 21, p. 253–265, 1985.
- SMITH, D. J. et al. Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1253–1260, 1987.
- SMITH, M. A. et al. Effects of Stress on Neurotrophic Factor Expression in the Rat Brain. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 234–239, 1995.
- STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 153–187, 1989.
- SUN, H.-L. et al. Role of hippocampal p11 in the sustained antidepressant effect of ketamine in the chronic unpredictable mild stress model. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 2, p. e741, 2016.
- TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 65, n. 4, p. 571–6, 2000.
- VUTSKITS, L. et al. Plasma concentrations of brain-derived neurotrophic factor in patients undergoing minor surgery: a randomized controlled trial. **Neurochemical research**, v. 33, n. 7, p. 1325–31, 2008.
- WANG, Y. et al. BDNF Val66Met polymorphism and plasma levels in Chinese Han population with obsessive-compulsive disorder and generalized anxiety disorder. **Journal of affective disorders**, v. 186, p. 7–12, 2015.

WHITE, P. F. et al. Pharmacology of Ketamine Isomers in surgical patients. **Anesthesiology**, v. 52, p. 231–239, 1980.

WHITE, P. F.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. Ketamine: Its Pharmacology and Therapeutic Uses. **Anesthesiology**, v. 56, n. 2, p. 119–136, 1982.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.

YANG, C. et al. Tramadol reinforces antidepressant effects of ketamine with increased levels of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B in rat hippocampus. **Frontiers of Medicine in China**, v. 6, n. 4, p. 411–415, 2012.

YILMAZ, A et al. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 341–4, 2002.

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Post-synaptic BDNF-TrkB Signaling in Synapse Maturation, Plasticity and Disease. **Development in Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 304–322, 2011.

ZANGROSSI, H. et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 637–45, 2001.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain research bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 2014.

ZARATE, C. A. et al. A Randomized Trial of an N-Methyl-D-Aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856–864, 2006.

ZARRINDAST, M. R. et al. Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior. **Neuroscience letters**, v. 505, n. 2, p. 65–70, 2011.

ZHANG, F. et al. Emulsified isoflurane anesthesia decreases brain-derived neurotrophic factor expression and induces cognitive dysfunction in adult rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 8, n. 2, p. 471–477, 2014.

ZHANG, G.-F. et al. Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 110, p. 8–12, 2013.

ZHANG, L.-M. et al. Anxiolytic effects of flavonoids in animal models of posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology**, v. 232, p. 663–672, 2015.

ZÖRNER B. et al. Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than "depressive". **Biological Psychiatry**. v. 54, n. 10, p. 972-82, 2003.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **048/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Investigação do mecanismo de ação do efeito itpo-panicolítico da ketamina.**" que tem como responsável o (a) docente **Vanessa Beijamini Harres**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 03/10/14.

Vitória (ES), 03 de outubro de 2014.


Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

ANEXO B

PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO RIPA COMPLEMENTADO POR INIBIDORES DE FOSFATASE E PROTEASE

Reagentes:

- Tampão RIPA (Sigma-Aldrich, EUA; 150 mM NaCl 150 mM, IGEPAL® CA-630 1,0%, deoxicolato de sódio 0, 5%, SDS 0,1%, e Tris 50 mM, pH 8,0) em alíquotas de 9 mL armazenadas no freezer -20°C até o momento do uso;
- Coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA) em alíquotas de 1 mL armazenadas no freezer -20°C;
- Ortovanadato de sódio a 2 mM em alíquotas de 100 µL e armazenadas no freezer -20°C até o momento do uso;
- Coquetel de inibidor de fosfatase 3 (Sigma-Aldrich; EUA) em alíquotas de 100 µL e armazenadas no freezer -4°C até o momento do uso;

Preparo do tampão RIPA complementado com inibidores de protease e fosfatase:

Adicionar em um tubo vórtex de 50mL:

- 9mL do tampão RIPA;
- 1 mL de inibidor de protease;
- 100 µL de ortovanadato de sódio;
- 100 µL do coquetel de inibidor de fosfatase 3;

Misturar os componentes do tampão com agitação branda, para evitar a formação de espuma.

Observações: O ortovanadato de sódio e o coquetel de inibidor de fosfatase inibem que ocorra a fosforilação da sua amostra. Entretanto, o ortovanadato de sódio inibe a fosforilação em resíduos de tirosina, e o coquetel inibidor de fosfatase inibe a fosforilação em resíduo de serina/treonina.