UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

WILLIAN LAZARINI LOPES

**Participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT7 do núcleo mediano da rafe
nas respostas comportamentais ao estresse de restrição e de nado forçado**

Ribeirão Preto

2017

WILLIAN LAZARINI LOPES

Participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT7 do núcleo mediano da rafe
nas respostas comportamentais ao estresse de restrição e de nado forçado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção de título de Mestre em
Ciências Médicas.

Área de Concentração: Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio, para fins de estudo e pesquisas, desde que citada a fonte original.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Willian Lazarini

Participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT7 do núcleo mediano da rafe
nas respostas comportamentais ao estresse de restrição e de nado forçado

104 páginas; 30cm

Dissertação de Mestrado defendida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo. Área de concentração: Neurologia/ Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

1. Estresse 2. Ansiedade 3. Depressão 4. Serotonina
5. Núcleo mediano da rafe 6. Receptor 5-HT7

Autor: Lopes, Willian Lazarini

Título: Participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT7 do núcleo mediano da rafe nas respostas comportamentais ao estresse de restrição e de nado forçado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Neurociências

Banca examinadora

Prof (a) Dr (a)

Prof (a) Dr (a)

Prof (a) Dr (a)

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan (orientadora)

Dissertação defendida em: / /2017

Agradecimentos

Agradeço à professora Cláudia M. Padovan pela oportunidade oferecida, pelo espaço físico cedido em seu laboratório e pela orientação que tive ao longo desta longa trajetória.

Agradeço aos meus amigos e companheiros do LNEP que estiveram comigo desde minha chegada ao laboratório (Adriana, Diego, Jean, Thiago Lord e Thiaguinho) e aos que chegaram neste barco mais tarde (Pedro, Priscila, Fabi, Rodrigo) por toda a experiência compartilhada e pelos bons momentos vividos no laboratório. Agradeço ao Rodrigo pela convivência durante meu último ano de mestrado, por sempre me ajudar quando necessário e pelos paralelos que foram surgindo pelo caminho. Agradeço à Thalita pela convivência que tivemos ao longo desses anos e por sempre estar à disposição para o que fosse preciso.

Agradeço também aos meus amigos e colegas do programa de pós graduação em Psicobiologia pela convivência, pelos cafés (e também pelas cervejas) tomados entre um experimento e outro e por sempre ajudarem quando preciso, como no uso de equipamentos e no ensino algumas técnicas.

Agradeço também aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental do departamento de Fisiologia da FMRP pelo companheirismo ao longo do meu último ano de mestrado. Um agradecimento em especial à Lívia pela grande ajuda em longas discussões sobre meus protocolos experimentais e em nossos projetos paralelos.

Agradeço a todos os funcionários e professores do programa de pós graduação em Neurologia/Neurociências da FMRP-USP. Agradeço, ao prof. João Pereira Leite, coordenador do programa durante quase todo meu período de mestrado, pela atenção e auxílios. Agradeço ao Cássio, estatístico do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP, pelos auxílios prestados. E finalmente agradeço à Silvana, secretária do programa de pós-graduação em Neurologia/Neurociências, por todos os auxílios prestados desde minha procura inicial pelo programa até às vésperas da minha defesa.

Agradeço à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (eterna Filô), por toda estrutura cedida, uma vez que todo este projeto que foi realizado nas dependências desta faculdade, além de ter sido o meu local de formação como biólogo. Agradeço a todos os funcionários envolvidos desde a limpeza até a manutenção dos laboratórios e das áreas externas da Filô por proporcionarem sempre um excelente local de trabalho.

Agradeço também aos funcionários do Biotério Central do campus da USP Ribeirão todo serviço prestado e realizado, desde a criação dos animais utilizados nas pesquisas até a entrega deles nos laboratórios.

Agradeço aos meus pais, Cristina e Roberto, por todo apoio que me deram, sempre que preciso, até nos momentos mais difíceis. Obrigado por estarem ao meu lado nesta etapa da minha vida.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que me foi concedido, desde minha iniciação científica até meu mestrado, fato que possibilitou a execução deste projeto, bem como a realização de minha pós-graduação.

Agradeço à sociedade brasileira, pois é ela quem custeia nossas Universidades públicas, Universidades de qualidade, de excelência e com reconhecimento internacional, como é a Universidade de São Paulo.

RESUMO

Lopes, W. L. Participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₇ do núcleo mediano da rafe nas respostas comportamentais ao estresse de restrição e de nado forçado. 2017. 106 f. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017.

Estímulos aversivos e estressores são capazes de gerar alterações, fisiológicas e comportamentais. A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor que está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos e comportamentais, como a adaptação a eventos estressantes. Disfunções no sistema serotoninérgico estão associados a transtornos, como a depressão e a ansiedade. O estresse de restrição por contenção de movimentos é capaz de induzir alterações comportamentais ansiogênicas no labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto que o nado forçado (NF) promove alterações comportamentais do tipo depressivas. As principais projeções serotoninérgicas do prosencéfalo são as que partem do núcleo mediano da rafe (NMR) em direção ao Hipocampo Dorsal (HD), e seriam estas projeções as responsáveis pela adaptação a estressores. O 5-HT₇ é um receptor de 5-HT presente em diversas estruturas encefálicas, dentre elas o NMR. Dados da literatura sugerem que a adaptação ao estresse possa envolver a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT₇ no NMR. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se há participação dos receptores 5-HT₇ do NMR tanto no comportamento tipo ansioso, quanto no depressivo induzidos por estressores incontrolláveis. Para isso, ratos *Wistar* com cânula-guia direcionada ao NMR passaram por um evento de restrição forçada aguda (duas horas), recebendo injeções intra-NMR de salina, LP-44 e/ou SB-258741 (agonista e antagonista de 5HT₇, respectivamente), imediatamente antes ou depois da restrição forçada. Os animais foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE) 24 horas depois. Em outra condição experimental os animais foram expostos ao estresse de restrição e 24 horas depois, imediatamente antes do teste no LCE, receberam o tratamento intra-NMR. Duas condições controles foram realizadas nas quais os animais não passaram pelo estresse, recebendo injeções intra-NMR imediatamente ou 24 horas antes do LCE. No modelo do nado forçado o tratamento intra-NMR foi realizado imediatamente antes ou depois da sessão pré-teste ou imediatamente antes do teste (24 horas após o pré-teste). Novamente, duas condições controles foram realizadas sem a exposição ao pré-teste, com a intervenção farmacológica imediatamente ou 24 horas antes da sessão teste. O comportamento dos animais foi filmado por 5 minutos, tanto no LCE, quanto na sessão teste do nado forçado, para posterior análise. Após os testes comportamentais, os animais foram perfundidos para conservação e remoção do encéfalo e posterior análise histológica dos sítios de injeção. A análise estatística foi realizada por meio de uma análise de variância de uma via (ANOVA One-Way), de acordo com o experimento. Os animais com sítio de injeção localizados fora do NMR foram excluídos das análises estatísticas. Os resultados indicam que a ativação dos receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT₇ do NMR é capaz de impedir as manifestações comportamentais do tipo ansiogênica e depressivas, no LCE e no NF, respectivamente. O bloqueio dos receptores 5-HT₇ com SB-258741 previamente ao LP-44 foi capaz de bloquear o efeito produzido pelo agonista quando administrado isoladamente. Estes resultados indicam que a ativação dos receptores 5-HT₇ do NMR é capaz de impedir as manifestações comportamentais tipo ansiosa e depressiva induzidas por estressores incontrolláveis. Dessa forma, este estudo apresenta novos resultados que mostram o envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT₇ que auxiliarão no entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na adaptação ao estresse.

Palavras chave: estresse, ansiedade, depressão, serotonina, núcleo mediano da rafe, receptor 5-HT₇

ABSTRACT

Lopes, W. L. Participation of serotonin receptor type 5-HT₇ of the median raphe nuclei in the behavioral responses to restraint stress and forced swimming. 2017. 106 f. Dissertation (masters). São Paulo University, Ribeirão Preto Medical School, 2017.

Stressors and aversive stimuli are capable of generating changes on physiology and behavior. Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter that is involved in the regulation of many, psychological, physiological and behavioral processes, such as adaptation to stressful events. Dysfunctions in the serotonergic system are associated with disorders as depression and anxiety. The restraint stress is able to induce anxiogenic behavioral changes in the elevated plus maze (EPM) test, while the forced swimming test (FST) promotes depressive-like changes in behavior. The major serotonergic projections to the forebrain are those that starts from the median raphe nucleus (MRN) towards the dorsal hippocampus (DH), and these projections are responsible for adaptation to the stressors. 5-HT₇ is a 5-HT receptor present in several brain structures, including MRN. Data from the literature suggest that stress adaptation may involve facilitation of neurotransmission mediated by 5-HT₇ in MRN. Thus, the aim of this study was to investigate if 5-HT₇ receptors of the MRN are involved in both, anxious and depressive behavior induced by uncontrollable stressors. For this, *Wistar* rats with an guide-cannula directed to MRN were underwent to two hours of restraint stress, receiving intra-MRN injections of saline solution, LP-44 and / or SB-258741 (agonist and antagonist of 5-HT₇ receptor, respectively), immediately before or after the restraint stress event. Animals were tested in EPM 24 hours later. In another experimental condition, the animals were submitted to restraint stress and 24 hours later, immediately before the EPM test, they received the intra-MRN treatment. Two control conditions were performed in which the animals were not stressed, receiving intra-MRN injections immediately before or 24 hours before the EPM test. Another animal model used in this study was the forced swimming test (FST) to investigate depressive like-behaviors. Animals receive intra-MRN treatments immediately before or after the pre-test session or immediately before the test (24 hours post-test). Again, two control conditions were performed, without exposure to the pre-test session, with the pharmacological intervention immediately before or 24 hours before the test session of the FST. The behavior of the animals was recorded for 5 minutes in both, EPM and FST, for future analysis. After the behavioral tests, animals were perfused for preservation of tissue and brain removal to further histological analysis of the injection sites. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis, according to experience. Animal with injection site outside the MRN were excluded from statistical analysis. The results of this study indicates that activation of 5-HT₇ receptors of the MRN increase the exploration of the open arms in the EPM and reduce the immobility in the FST. Injections of SB-258741 prior to LP-44 was able to block the effect produced only by the agonist. These results indicate that activation of the 5-HT₇ of the MRN prevents the anxiety and depressive-like behaviors induced by uncontrollable stress. Thus, this study presents new results showing the direct participation of 5-HT₇ receptors that will help the understanding of neurobiological mechanisms behind the adaptation to stress.

Key words: stress, anxiety, depression, serotonin, median raphe nucleus, 5-HT₇ receptor.

Lista de figuras

Figura 1: fórmula estrutural da molecular da serotonina.....	22
Figura 2: Aparelho estereotáxico utilizado nas cirurgias para implantação de cânula.....	34
Figura 3: gaiola de contenção utilizada para restrição forçada	36
Figura 4: Labirinto em Cruz Elevado.....	37
Figura 5: Cilindro utilizado no teste do nado forçado.....	37
Figura 6: Esquema representativo do momento das intervenções farmacológicas intra-NMR para as cinco condições experimentais estudadas.....	40
Figura 7: esquema representativo das etapas envolvidas no procedimento de perfusão transcardíaca e remoção do encéfalo.....	42
Figura 8: Esquema representativo do protocolo de estresse de restrição seguido pelo LCE com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente antes da restrição.....	47
Figura 9: Esquema representativo do protocolo de estresse de restrição seguido pelo LCE com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente depois da restrição.....	47
Figura 10: Esquema representativo do protocolo controle com manipulação dos receptores 5-HT ₇ 24 horas antes do LCE na ausência do estresse de restrição.....	48
Figura 11: Esquema representativo do protocolo de estresse de restrição seguido pelo LCE 24 horas depois com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente antes do teste.....	48
Figura 12: Esquema representativo do protocolo controle com manipulação dos receptores 5-HT ₇ imediatamente antes do LCE na ausência do estresse de restrição.....	49
Figura 13: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente antes do pré-teste.....	50
Figura 14: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente depois do pré-teste.....	51
Figura 15: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H ₇ 24 horas antes do teste, sem exposição ao pré-teste.....	51
Figura 16: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente antes do teste e 24 horas depois do pré-teste.....	52
Figura 17: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H ₇ imediatamente antes do teste sem exposição prévia ao pré-teste.....	52
Figura 18: Sítios de injeção confirmados para o núcleo mediano da rafe.....	54

Figura 19: Ausência de efeito do LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT ₇ , respectivamente), administrados no NMR de ratos, sobre a atividade exploratória no LCE na ausência de um evento estressor prévio.....	56
Figura 20: Administração de LP-44 no NMR imediatamente antes estresse de restrição impede as manifestações comportamentais resultantes do estresse 24 horas depois no LCE.....	58
Figura 21: Administração de LP-44 no NMR imediatamente após o estresse de restrição impede as manifestações comportamentais resultantes do estresse 24 horas depois no LCE.....	60
Figura 22: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no NMR de ratos sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado 24 horas depois.....	62
Figura 23: Administração de LP-44 no NMR de ratos 24 horas após o estresse de restrição bloqueia as manifestações comportamentais do estresse no LCE quando testados imediatamente após o tratamento.....	64
Figura 24: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no NMR de ratos imediatamente antes do teste no LCE sobre a atividade exploratória do animal.....	66
Figura 25: Validação do protocolo experimental do estresse de restrição seguido pela exposição ao LCE 24 horas depois. Foi demonstrado aumento da aversão aos braços abertos nos animais estressados.....	68
Figura 26: Administração de LP-44 no NMR de ratos imediatamente antes da sessão pré-teste do nado forçado reduz o comportamento tipo depressivo expresso na sessão teste 24 horas depois...	70
Figura 27: Administração de LP-44 no NMR rato de, imediatamente depois da sessão pré-teste do nado forçado reduz o comportamento tipo depressivo expresso na sessão teste 24 horas depois...	72
Figura 28: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no núcleo mediano da rafe de ratos, 24 horas antes da sessão teste do nado forçado sem a exposição prévia ao pré-teste.....	74
Figura 29: Administração de LP-44 no NMR de ratos 24 horas após o pré-teste reduz os comportamentos de tipo depressivo na sessão teste imediatamente após o tratamento farmacológico.....	76
Figura 30: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no núcleo mediano da rafe de ratos imediatamente antes do teste no nado forçado, sem a exposição prévia ao pré-teste 24 horas antes.....	78
Figura 31: Validação do protocolo experimental do nado forçado com o pré-teste 24 horas antes do teste. Foi demonstrado aumento do comportamento tipo depressivo (imobilidade) nos animais que passaram pelo pré-teste.....	79

Lista de tabelas

Tabela 1: divisão dos sete tratamentos farmacológicos utilizados na curva dose-resposta do agonista (LP-44) e antagonista (SB-258741) de 5-HT ₇ intra-NMR.....	46
Tabela 2: divisão dos tratamentos farmacológicos utilizados no protocolo de estresse de restrição seguido pela exposição no LCE e no teste do nado forçado.....	47
Tabela 3: Comportamentos secundários (média ± EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente antes do pré-teste.....	70
Tabela 4: Comportamentos secundários (média ± EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente depois do pré-teste.....	72
Tabela 5: Comportamentos secundários (média ± EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR 24 horas antes e não passaram pelo pré-teste...	74
Tabela 6: Comportamentos secundários (média ± EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente do teste e passaram pelo pré-teste 24 horas antes.....	76
Tabela 7: Comportamentos secundários (média ± EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente do teste sem passar pelo pré-teste.....	78

Lista de abreviaturas e siglas

µl – microlitro	MAO – monoaminooxidase
5-HT – serotonina	mg. – miligrama
5-HT1A – receptor de serotonina 5-HT1A	ml – mililitro
5-HT7 – receptor de serotonina 5-HT7	mm – milímetro
AD – adrenalina	NA – noradrenalina
ADT – antidepressivo tricíclico	NDR – núcleo dorsal da rafe
AL – atividade locomotora	NF – nado forçado
AMPC – AMP cíclico	nmol – nanomol
ANOVA – Análise de Variância	NMR – núcleo mediano da rafe
BHE – barreira hematoencefálica	OMS – organização mundial de saúde
Cm – centímetro	RNAm – RNA mensageiro
DA – dopamina	SB-258741 – antagonista de receptor 5-HT7
DSM – <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>	s.c. – subcutânea
FA – frequência nos braços abertos	TA – tempo nos braços abertos
FF – frequência nos braços fechados	TI – tempo de imobilidade
g. – gramas	
HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal	
i.m. – intramuscular	
i.p. – intraperitoneal	
IMAO – Inibidor de Monoaminooxidase	
ISRS – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina	
Kg. – quilograma	
LCE – labirinto em cruz elevado	
LI – latência para primeiro episódio de imobilidade	
LP-44 – agonista de receptor 5-HT7	

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1 Estresse.....	18
1.2 Estresse vs depressão vs ansiedade.....	19
1.3 Serotonina.....	21
1.4 Redes neurais de adaptação ao estresse.....	24
1.5 Receptor 5-HT7.....	25
1.6 Modelos animais.....	28
<i>1.6.1 Estresse de restrição seguido pelo LCE.....</i>	<i>28</i>
<i>1.6.2 Nado Forçado.....</i>	<i>29</i>
1.7 Hipótese.....	30
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. Material e métodos.....	33
3.1 Animais	34
3.2 Materiais, Equipamentos e Fármacos.....	34
<i>3.2.1 Para a cirurgia estereotáxica.....</i>	<i>34</i>
<i>3.2.2 No procedimento de restrição forçada.....</i>	<i>35</i>
<i>3.2.3 Para os experimentos de injeção intra-NMR.....</i>	<i>36</i>
<i>3.2.4 Para o teste do labirinto em cruz elevado.....</i>	<i>36</i>
<i>3.2.5 Para o teste no nado forçado (NF).....</i>	<i>37</i>
<i>3.2.6 Para o procedimento de perfusão.....</i>	<i>37</i>
<i>3.2.7 Para preparação e análise do material histológico.....</i>	<i>38</i>
3.3. Procedimentos experimentais.....	38

3.3.1 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia.....	38
3.3.2 Restrição forçada.....	39
3.3.3 Injeção intra-NMR.....	39
3.3.4 Teste no labirinto em cruz elevado (LCE).....	40
3.3.5 Teste do Nado Forçado (NF).....	40
3.3.6 Perfusão transcardíaca.....	41
3.3.7 Análise histológica.....	42
3.3.8 Análise estatística.....	43
4. Estudos Comportamentais.....	44
4.1 Curva dose-resposta.....	45
4.2 Restrição forçada seguida pelo LCE.....	46
4.2.1 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes do estresse de restrição.....	46
4.2.2 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente depois do estresse de restrição.....	47
4.2.3 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR 24 horas antes do LCE na ausência do estresse de restrição (condição controle).....	47
4.2.4 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes do teste no LCE e 24 horas após o estresse de restrição.....	48
4.2.5 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes do teste LCE na ausência do estresse de restrição (condição controle).....	48
4.3 Nado forçado.....	49
4.3.1 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H ₇ do NMR imediatamente antes do pré-teste do NF.....	49
4.3.2 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H ₇ do NMR imediatamente depois do pré-teste do NF.....	50
4.3.3 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H ₇ do NMR 24 horas antes da sessão teste sem exposição ao pré-teste do NF (condição controle).....	51
4.3.4 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H ₇ do NMR imediatamente antes da sessão teste do NF e 24 horas depois do pré-teste.....	51

4.3.5 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes da sessão teste do NF sem exposição prévia ao pré-teste (condição controle).....	52
5. Resultados	53
5.1 Histologia.....	54
5.2 Curva dose-resposta.....	55
5.3 Restrição forçada seguido pelo LCE.....	57
5.3.1 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes do estresse de restrição sobre a atividade exploratória no LCE 24 horas depois.....	57
5.3.2 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente depois do estresse de restrição sobre a atividade exploratória no LCE 24 horas depois.....	59
5.3.3 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR sobre a atividade exploratória no LCE 24 horas depois (condição controle).....	61
5.3.4 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR de ratos previamente estressados sobre o comportamento no LCE imediatamente após a manipulação.....	63
5.3.5 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes do teste no LCE (condição controle).....	65
5.3.6 Validação do protocolo experimental da restrição forçada seguida pelo LCE.....	67
5.4 Nado forçado.....	69
5.4.1 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR de ratos imediatamente antes do pré-teste do NF sobre o comportamento expresso no teste 24 horas depois.....	69
5.4.2 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR de ratos imediatamente depois do pré-teste do NF sobre o comportamento expresso no teste 24 horas depois.....	71
5.4.3 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR 24 horas antes do teste do NF sem exposição ao pré-teste (condição controle).....	73
5.4.4 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR de ratos imediatamente antes do teste do NF em ratos que passaram pelo pré-teste 24 horas antes.....	75

5.4.5 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT ₇ do NMR imediatamente antes do teste do NF em ratos não expostos ao pré-teste (condição controle).....	77
5.4.6 Validação do protocolo experimental do NF.....	79
6. Discussão.....	80
7. conclusão.....	92
Referências Bibliográficas.....	94
Anexos.....	105

1. Introdução

1.1 Estresse

O termo “stress” foi usado pela primeira vez na área das ciências biológicas pelo fisiologista húngaro Hans Selye em 1936. Selye utilizou a palavra estresse para designar a resposta geral e inespecífica de um sistema biológico sobre qualquer exigência ou demanda realizadas sobre ele, sendo manifestado por meio da Síndrome Geral de Adaptação (SGA). Posteriormente, a palavra estresse passou a designar também a causa da SGA, ou o agente estressor (SELYE, 1973, SELYE 1975).

A resposta ao estressor compreende aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, visando propiciar uma melhor percepção da situação e um processamento mais rápido da informação disponível, possibilitando a busca por soluções a partir de condutas rápidas e vigorosas (McEwen, 2000, MARGIS et al., 2003). Selye também destaca que o estresse não pode ser evitado, uma vez que sempre haverá demandas sobre um organismo e que a única maneira de um organismo se ver completamente livre de estresse é a morte (SELYE, 1973).

Se analisarmos do ponto de vista evolutivo, o estresse muitas vezes está relacionado com situações de defesa dos animais, assim como o medo e a ansiedade. Dessa forma, diferentes estruturas cerebrais, bem como diferentes mecanismos neurais e endócrinos, estão envolvidos na resposta ao estresse que, por sua vez, varia dependendo do nível e da forma de ameaça. Nesse sentido, foram estabelecidos três eixos de resposta fisiológica ao estresse. O eixo neural se ativa imediatamente, frente a uma situação de estresse. O eixo neuroendócrino tem sua ativação mais lenta, necessitando de condições de estresse mais duradouras. O eixo endócrino se caracteriza por um disparo mais lento e por efeitos mais duradouros que os anteriores, além disso, as condições de estresse devem ser mantidas por ainda mais tempo (MARGIS et al., 2003).

Recentemente, foi sugerido que o cérebro é o principal alvo de resposta ao estresse, de forma que a ativação de estruturas centrais envolvidas na resposta ao estresse são capazes de gerar as modificações adaptativas e reorganização neuronal (HUETHER et al., 1999). O processo de reação ao estresse desencadeia respostas específicas à níveis fisiológicos, cognitivos, emocionais e comportamentais, de forma que experiências repetidas podem favorecer a adaptação de um indivíduo às demandas necessárias (HUETHER et al., 1999).

Uma das principais respostas biológicas ao estresse é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que resulta na liberação de glicocorticóides pelas glândulas adrenais (HERMAN; CULLINAN; 1997). Devido à sua natureza lipofílica, os glicocorticoides podem facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), entrar no sistema nervoso central e se ligar aos receptores de glicocorticoides. A maior parte dos efeitos dos glicocorticoides é mediada por alterações à nível de expressão gênica, de modo que tais mudanças apresentam consequências de longa duração nas

funções neuronais, gliais e metabólicas (HUETHER et al., 1999). Com relação ao comportamento, a resposta ao estresse geralmente inclui reações de luta ou fuga ou aumento do estado de vigília, acompanhado por aumento dos níveis de ansiedade (McEwen, 2000). Estressores relacionados à situações de emergência induzem a liberação de epinefrina pela glândula adrenal e este efeito é acompanhado pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático, de forma que as repostas aos estressores envolvam maior estado de excitação e de alerta, como aumento da cognição, da atenção e da vigília, juntamente com a supressão das funções vegetativas. Ocorre portanto, o redirecionamento do uso energético, fazendo com que regiões do organismo responsáveis pela adaptação ao estresse, tanto comportamental quanto física, receba mais oxigênio e nutrientes (CHROUSOS; GOLD, 1992, KEMENY, 2003).

Outros autores destacam também o impacto de estressores sobre os comportamentos de tipo ansioso e depressivo, acompanhado por um aumento do estresse oxidativo em áreas límbicas (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001, PATKI et al., 2013), juntamente com redução do tempo dispendido com contato social, além de redução do comportamento sexual (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001).

1.2 Estresse vs depressão vs ansiedade

Evidências da literatura reforçam a relação entre estressores e distúrbios de humor, uma vez que, ao longo da vida, situações estressantes que envolvem ameaças, perdas e derrota social, por exemplo, podem influenciar a gênese e o curso da depressão (CASPI et al., 2003).

A depressão pode surgir em diversos quadros clínicos, como no estresse pós-traumático, na esquizofrenia e no alcoolismo, além de ocorrer também como uma resposta a situações estressantes. Ela não acarreta apenas alterações de humor, mas também inclui alterações cognitivas, psicomotoras e vegetativas. (DEL PORTO, 1999).

A maior parte das pesquisas clínicas disponíveis atualmente utiliza o Manual Estatístico dos Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM*), elaborado pela *American Psychiatric Association* (APA), que define a forma mais comum da síndrome da depressão como sendo o transtorno depressivo maior (TDM). O DSM V destaca os sintomas necessários para o diagnóstico da depressão, de forma que devem estar presentes pelo menos dois destes sintomas por no mínimo duas semanas. Dentre estes sintomas podemos destacar o desinteresse pelas atividades do cotidiano, sentimentos de culpa excessivos, dificuldade de concentração mental, pensamentos recorrentes sobre morte ou tentativa de suicídio, humor deprimido durante a maior parte do dia, insônia ou excesso de sono, entre outros (APA, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, em 2020, a depressão será a segunda maior questão de saúde pública e incapacidade que acometerá a população mundial. A OMS também alerta para mudanças nas necessidades de saúde da população devido ao fato de que doenças como a depressão, e outros distúrbios psiquiátricos, estão substituindo com rapidez os problemas causados por doenças infecciosas e desnutrição (WHO, 2012).

De acordo com o Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS, 2012), a depressão é um problema de saúde pública que anualmente acarreta gastos econômicos estimados em bilhões, uma vez que os pacientes deprimidos apresentam limitações de suas atividades cotidianas, buscando, assim, serviços de saúde pública com maior frequência. Ainda de acordo com o Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologia em Saúde (2012), a partir de amostras de diversas capitais brasileiras, foi estimado que cerca de 12% da população destas cidades apresentavam quadros clínicos relacionados à depressão. Além disso, a reincidência de episódios de depressão é de aproximadamente 80% ao longo da vida (FLECK et al., 2009).

A ansiedade generalizada, forma mais comum de ansiedade, pode ser diagnosticada de acordo com critérios utilizados pelo DSM, dos quais destacam-se a preocupação excessiva, dificuldades para controlar tais preocupações a ponto de ter as atividades do cotidiano prejudicadas, dificuldade para se concentrar, irritabilidade, tensão muscular e alterações no padrão de sono (APA, 2014). Além disso, vale destacar que a ansiedade pode levar a alterações no comportamento, como aumento da aversão à situações potencialmente perigosas, um maior tempo dispendido no preparo para possíveis eventos negativos e tomadas de decisões influenciadas pelo excesso de preocupação (ANDREWS et al., 2010).

Vemos assim quem a ansiedade é capaz de trazer prejuízos ao indivíduo e, assim como na depressão, os pacientes têm a necessidade de políticas públicas eficazes na área da saúde mental (BAXTER et al., 2013). Em um estudo realizado com população universitária, foi constatado que mais de 50% dos estudantes apresentavam sintomas de ansiedade (YUSOFF, 2013). Nesta mesma linha, em uma extensa revisão da literatura sobre prevalência global da ansiedade, Baxter et al. (2013) constataram que a prevalência de ansiedade era maior em regiões onde a população estava exposta a conflitos, assim como a prevalência de depressão relacionada ao estresse pós traumático.

De acordo com Mineka et al. (1998), a aparição de uma desordem de humor muitas vezes é precedida por uma desordem de ansiedade, de forma que o diagnóstico de uma desordem de ansiedade aumenta os riscos de um futuro diagnóstico de depressão, risco que pode se manter maior por longos períodos, superiores até a um ano (MINEKA; WATSON; CLARK, 1998).

É possível observar, portanto, a estreita relação entre ansiedade e depressão, sendo esta uma das comorbidades mais frequentes em pacientes com desordens de humor, de forma que mais da

metade dos pacientes depressivos também apresentam sintomas de ansiedade, sendo que esta comorbidade frequentemente está relacionada a estados mais severos de psicopatologia (GORMAN, 1997, SCHOEVERS et al., 2003, KROENKE et al., 2007)

1.3 Serotonina

Nas últimas décadas, com o avanço das pesquisas nas áreas de neurociências e neurobiologia do comportamento e dos distúrbios de humor, foi possível estabelecer hipóteses fisiopatológicas tanto para a depressão quanto para a ansiedade, com alterações de múltiplos sistemas de neurotransmissão e adaptações moleculares aos antidepressivos (LAFER; FILHO, 1999). A principal teoria que envolve neurotransmissores cerebrais é relacionada às monoaminas (BAHLS, 1999). As monoaminas subdividem-se em catecolaminas e indolaminas. A categoria das catecolaminas é composta pela dopamina (DA), noradrenalina (NA) e adrenalina (AD), enquanto que a categoria das indolaminas inclui a serotonina (5-HT) e a histamina (GOLAN et al., 2009).

A hipótese de que as monoaminas estão relacionadas com a depressão se baseia na deficiência das aminas biogênicas, particularmente NA, DA, e 5-HT em pacientes depressivos (ABBAS et al., 2009). Além disso, o atual conhecimento sobre a complexa relação entre os sistemas de neurotransmissores cerebrais trouxe para o foco dos estudos neurobiológicos da depressão os receptores dos neurotransmissores (BAHLS, 1999). O interesse a respeito da importância dos receptores deriva de achados relacionados à depleção de monoaminas gerar aumento do número de receptores pós-sinápticos (*up-regulation*) e também do fato de estudos realizados com cérebros de pacientes suicidas mostrarem um aumento no número de receptores de serotonina de tipo 5-HT_{2C} no córtex frontal e redução de 5-HT_{1A} hipocampal (CHEETHAM, et al., 1990, HRDINA et al., 1993).

A 5-HT, também chamada de 5-hidroxitriptamina (figura 1), é um neurotransmissor de ação excitatória e inibitória que exerce funções relacionadas com a regulação de processos fisiológicos e comportamentais, como humor, dor, sono, aprendizagem e memória, fome, sede, medo, comportamento agressivo, ritmos circadianos, estresse, atividade locomotora, além de processos relacionados à recompensa e reforço (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008; SCHENKEL, 2011).

Figura 1: fórmula estrutural da molécula de serotonina.

Os neurônios serotoninérgicos estão presentes, principalmente, dentro de regiões específicas localizadas no tronco encefálico, denominadas de núcleos da rafe, sendo os principais os núcleos magno, dorsal e mediano, de forma que as principais vias serotoninérgicas ascendentes se originam dos núcleos dorsal e mediano, enquanto que o núcleo magno é a principal via serotoninérgica descendente (BRANDÃO, 2004). Vale destacar que a maior parte das fibras que partem do núcleo mediano da rafe (NMR) se projetam para áreas límbicas, como o hipocampo e o tálamo, enquanto que fibras que partem do núcleo dorsal (NDR) projetam-se para os colículos, para a substância cinzenta periaquedutal, amígdala e neocórtex (BRANDÃO, 2004).

A 5-HT, por ser uma molécula polar, não é capaz de atravessar a BHE, sendo sintetizada, portanto, a partir de seu precursor, o triptofano, um aminoácido adquirido na dieta que é capaz de atravessar a BHC. No citoplasma dos neurônios serotoninérgicos o triptofano é convertido em 5-HT por meio de um processo que depende da disposição de duas enzimas, primeiramente da enzima triptofano hidroxilase (TPH) e posteriormente da enzima 5-Hidroxitriptofano descarboxilase. A síntese desse neurotransmissor pode ser controlada pela quantidade de triptofano presente no fluido extracelular dos neurônios serotoninérgicos, mas como o triptofano é um aminoácido adquirido na dieta, uma alimentação pobre em triptofano pode causar uma diminuição nos níveis de 5-HT.

Por outro lado, a degradação da 5-HT se dá principalmente pela enzima monoaminoxidase (MAO), que regula os níveis de 5-HT nos tecidos neurais. Uma vez na sinapse, a 5-HT pode interagir com receptores pré e pós-sinápticos. Além da interação com os receptores sinápticos, a 5-HT também pode sofrer recaptação, um processo de extrema importância no controle da disponibilidade dos neurotransmissores na fenda sináptica e que também é sensível a ação de alguns fármacos (SCHENKEL, 2011). A recaptação da 5-HT é realizada por proteínas de transporte de 5-HT (5-HTT) que se ligam à 5-HT liberada na fenda sináptica, transportando-a através da membrana plasmática do neurônio pré-sináptico (SGHENDO; MIFSUD, 2012).

Disfunções no sistema serotoninérgico estão associadas a diversos transtornos, como a depressão (SARGENT et al., 2000), dessa forma, o tratamento crônico com drogas antidepressivas

aumenta a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica, reestabelecendo, assim, os níveis de neurotransmissão serotoninérgica (SCHENKEL, 2011).

Devido a elucidação do papel das monoaminas nas desordens de humor, principalmente a 5-HT, os tratamentos farmacológicos acabam sendo voltados para esses sistemas de neurotransmissores (MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, 1999). Até os anos 80, haviam apenas duas classes de antidepressivos, os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os inibidores de monoaminooxidase (IMAO). Os ADT, recebem este nome devido aos seus três anéis benzênicos e seu mecanismo de ação consiste na redução da recaptação de 5-HT, NA e norepinefrina através do bloqueio dos seus respectivos transportadores de recaptação que estão presentes na fenda sináptica, aumentando, assim, a disponibilidade desses neurotransmissores na sinapse. Entretanto, os ADT atuam também de forma a bloquear receptores muscarínicos, histaminérgicos e adrenérgicos. Esses mecanismos de ações não estão correlacionados com os efeitos antidepressivos e sim com os efeitos colaterais que podem ser gerados por estes fármacos (MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, 1999). Já os IMAO atuam inibindo a ação das MAO, que por sua vez, se subdividem de acordo com seus sistemas de atuação, podendo ser o serotoninérgico ou o noradrenérgico. Apesar de serem muito eficazes, esses medicamentos apresentavam efeitos colaterais indesejáveis devido à baixa seletividade farmacológica e a administração em altas doses pode ser letal (MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, 1999, GOLAN et al., 2009).

Nas últimas duas décadas, novas classes de antidepressivos surgiram, sendo que estas apresentam maior seletividade farmacológica, além de menos efeitos colaterais em comparação aos ADT e IMAO (MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, 1999). No final da década de 80, o tratamento da depressão foi revolucionado com a introdução dos Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS). Os ISRS estão atualmente entre as drogas mais prescritas para o tratamento da depressão e de outros transtornos psicológicos, como a ansiedade, a esquizofrenia e o transtorno do pânico (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008). Alguns exemplos mais comuns são o citalopram, a fluoxetina e a sertralina. A recaptação de um neurotransmissor reduz o seu nível na fenda sináptica mais rapidamente do que a difusão, limitando os efeitos dos neurotransmissores liberados na sinapse (SGHENDO; MIFSUD, 2012). Assim, ao inibir a recaptação de 5-HT para o neurônio pré-sináptico, os ISRS aumentam os níveis de 5-HT na fenda sináptica. Seu mecanismo de ação é semelhante ao dos ADT, porém são mais seletivos para os transportadores de 5-HT e, por isso, apresentam menos efeitos adversos (GOLAN et al., 2009; DOZE; PEREZ, 2012).

Além disso, um fato importante a ser destacado é que, na maioria dos pacientes depressivos com ansiedade associada como comorbidade, o tratamento com antidepressivos também atenua os

sintomas da ansiedade. Dessa forma, o reestabelecimento dos níveis serotoninérgicos é capaz de atenuar sintomas de ambas as patologias (KROENKE et al., 2007), uma vez que estruturas ricas em neurônios serotoninérgicos inervam áreas responsáveis pela modulação tanto de comportamentos do tipo ansioso, quanto depressivo (GRAEFF et al., 1996, DEAKIN, 1998).

1.4 Redes neurais da adaptação ao estresse

Com relação às redes neurais, o NMR e o NDR contém corpos celulares da maior parte dos neurônios serotoninérgicos que inervam o prosencéfalo (CALIZO et al., 2011). As vias serotoninérgicas ascendentes que partem do NDR se projetam para os colículos, a substância cinzenta eriaquedutal, a amígdala e o córtex, enquanto que as do NMR se projetam para o tálamo e áreas inervadas pelo feixe prosencefálico medial (BRANDÃO, 2004). O hipocampo, neste caso, se mostra como sendo um dos principais alvos da ascensão serotoninérgica do NMR, juntamente com a região septal. Os axônios da via NMR-hipocampo inervam principalmente as células da CA1 e a zona infragranular do giro denteado (VERTES; FORTIN; CRANE, 1999).

Deakin e Graeff (1991), propuseram que o sistema serotoninérgico central estaria relacionado com respostas adaptativas à eventos aversivos. Nesse sentido, os autores sugeriram que as projeções serotoninérgicas que partem do NMR em direção ao hipocampo, uma estrutura rica em receptores de 5-HT, seriam as responsáveis pela desconexão de aprendizados e experiências prévias, caso estas levem a uma resposta comportamental do tipo aversiva. Além disso, também já foi dado destaque para a via NMR-hipocampo dorsal na modulação do comportamento tipo ansioso.

De acordo com Gray e McNaughton (2000), o hipocampo tem um importante papel na solução de conflitos. Ele recebe projeções córtico-hipocampais e na ausência destas projeções, o estímulo que se sobrepõe é o que chega ao hipocampo por meio da via NMR-hipocampo, levando a uma resposta comportamental do tipo aversiva. Desta forma, o hipocampo estaria envolvido em situações de conflito comportamental. Além disso, foi sugerido que a potencialização da neurotransmissão serotoninérgica, mediada por receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, pode interferir nas respostas comportamentais à eventos aversivos, aumentando a resiliência ou a tolerância ao estresse (DEAKIN; GRAEFF, 1991, GRAEFF et al., 1996). Porém, o alto nível de glicocorticóides causado por eventos aversivos e estressantes, dificultaria a adaptação do animal por interferência na neurotransmissão serotoninérgica hipocampal, principalmente aquela mediada por 5-HT_{1A}R, (CHAOULOFF, 1995).

Os experimentos realizados por Kennett et al. (1985a; 1987), deram respaldo à teoria de Deakin e Graeff (1991), os quais mostraram que a exposição ao estresse de restrição inescapável de duas horas levava a uma diminuição da atividade exploratória no modelo do campo aberto 24 horas

depois. Esta diminuição era atenuada quando os animais eram tratados com o 8-OH-DPAT, agonista de 5-HT_{1A}R, e desaparecia quando os animais eram repetidamente expostos à restrição. Reforçando o papel da serotonina, o tratamento crônico com 5-MeDMT, um agonista de receptores de serotonina de tipo 5-HT₁, simultaneamente ao estresse de restrição repetido induziu sinais da chamada Síndrome Serotoninérgica, sugerindo que a adaptação ao estresse estaria acompanhada de um fortalecimento da neurotransmissão mediada por 5-HT_{1A} (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985a). Entretanto, os sítios cerebrais envolvidos na mediação desses efeitos não foram investigados.

Posteriormente, vários trabalhos na literatura mostraram que o hipocampo dorsal estaria envolvido na mediação de parte desses efeitos. Nesse sentido, a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT_{1A} no hipocampo (PADOVAN; GUIMARÃES, 1993, JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003) ou no NMR (ALMEIDA et al., 2013) é capaz de atenuar os efeitos comportamentais da exposição a estressores inescapáveis, tanto em modelos de ansiedade, quanto em modelos de depressão. De forma contrária, lesões no NMR resultam em comportamentos ansiogênicos (NETTO et al., 2002). Dessa forma, a via NMR-hipocampo se mostra sendo de grande importância na tolerância ou resistência ao estresse (GRAEFF et al., 1996), bem como na modulação do comportamento ansioso (ANDRADE, ZANGROSSI, GRAEFF, 2013). Porém, como os estressores já induzem um aumento na secreção de glicocorticóides (HERMAN; CULLINAN, 1997) e o sistema serotoninérgico está presente na modulação dos efeitos dos glicocorticóides em transtornos do humor, as alterações da neurotransmissão serotoninérgica sobre o eixo HPA podem ser interpretadas como contribuições para as alterações endócrinas observadas na depressão (Graeff et al., 1996, SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2010). Portanto, ao interpretarmos os estímulos aversivos como um fator de estresse, o aumento dos níveis de glicocorticóides induzido pela aversão é capaz de dessensibilizar receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, de regiões límbicas como amígdala e hipocampo, dificultando, assim, a adaptação a estes eventos (CHAOULOFF, 1995).

1.5 Receptor 5-HT7

Até o momento foram identificados quatorze subtipos de receptores de 5-HT, que possuem ação excitatória e inibitória, e estes receptores estão agrupados em sete diferentes famílias (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ 5-HT₇), sendo todos eles receptores acoplados a uma proteína-G, exceto o receptor 5-HT₃ que é um canal iônico (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008).

O receptor de serotonina de tipo 7 (5-HT₇R; 5-HT₇) foi o último a ser identificado, tendo sido clonado de forma independente em 1993, por três diferentes laboratórios (BARD et al., 1993, LOVENBERG et al., 1993, RUAT et al., 1993). O 5-HT₇ é um receptor com sete domínios

transmembrânicos, acoplado a uma proteína-G estimulatória (proteína Gs), que ao ser ativada leva à formação de adenil ciclase (AMPC) a partir de um segundo mensageiro (BARD, et al., 1993, RUAT et al., 1993). O gene responsável por codificar este receptor está localizado no cromossomo humano 10q23.3-q24.3, apresentando 1344 pares de bases que codificam 447 aminoácidos, exibindo um elevado grau de homologia interespecies (>90%), porém apresenta uma baixa homologia com outros receptores de 5-HT (<40%) (BHALLA; SAXENA; SHARMA, 2002). Foram identificadas quatro isoformas do 5-HT₇R, sendo que ratos (5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)} e 5-HT_{7(c)}) e humanos (5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)} e 5-HT_{7(d)}) compartilham duas destas isoformas (HEIDMANN et al., 1997). Tais variações deste receptor são geradas por meio de *splicing* alternativo, mas não há evidências de perfis funcionais e/ou farmacológicos diferentes entre as isoformas já identificadas (GELERNTER et al., 1995, KROBERT et al., 2001).

O receptor 5-HT₇ foi encontrado inicialmente em diversos órgãos e tecidos corporais, com destaque para o sistema nervoso central. Desta forma, a fim de se conhecer a distribuição e a densidade dos receptores 5-HT₇ em regiões encefálicas, foram realizados estudos com o uso de diversas técnicas, como autoradiografia, hibridização *in situ* e imunohistoquímica.

Estudos que investigaram a distribuição do RNAm para 5-HT₇ encontraram uma intensa marcação no tálamo, no hipotálamo, na tênia tecta e na formação hipocampal, principalmente nas áreas CA1, CA2, CA3 e no córtex entorrinal. Encontraram também densidades moderadas de RNAm para 5-HT₇R em áreas como a amígdala e a tênia tecta (GUSTAFSON et al., 1996, NEUMAIER et al., 2001). De acordo com Gustafson et al. (2001), em todas as áreas, aparentemente, o RNAm para 5-HT₇R está presente apenas em neurônios e não em células gliais. Neumaier et al. (2001) realizaram um estudo com imunohistoquímica, hibridização *in situ*, e estimulação dos 5-HT₇R com agonista. Eles encontraram uma estreita relação entre a distribuição dos 5-HT₇R e a imunorreatividade para c-Fos, mostrando que a produção de c-Fos neste caso está relacionada com a ativação destes receptores.

Com relação aos estudos de imunohistoquímica e de autorradiografia, foram encontradas moderadas e altas densidades deste receptor nos núcleos talâmicos, no hipocampo, no córtex entorrinal, na amígdala, nas camadas mais superficiais do córtex, na substância *nigra*, no globo pálido, no colículo superior e nos núcleos da rafe (TO et al., 1995, GUSTAFSON et al., 2001).

Um estudo com animais knockout para 5-HT_{1A} e animais duplo knockout para 5-HT_{1A/1B} foi realizado buscando evitar possíveis intervenções farmacológicas inespecíficas nestes receptores (BONAVENTURE et al. 2002), uma vez que muitos fármacos que se ligam ao 5-HT₇R também apresentam afinidades por estes outros receptores. Foi observado que, em ambos os casos, as maiores densidades dos 5-HT₇R estavam presentes em áreas como o septo, o hipocampo, o córtex, a amígdala,

o tálamo, o hipotálamo e novamente em núcleos presentes no tronco encefálico, como os núcleos da rafe.

Martín-Cora e Pazos (2004) investigaram pela primeira vez a distribuição anatômica dos receptores de tipo 5-HT₇ no cérebro humano em sujeitos que morreram sem nenhuma história de doenças neuropsiquiátricas. Foram analisadas sessões do córtex frontal, estriado, hipocampo, hipotálamo, tálamo e do tronco encefálico. Neste mesmo estudo os autores também realizaram uma análise comparada com sessões de cérebros de ratos e cobaias. Eles observaram que grandes quantidades dos 5-HT₇R estavam presentes no estriado (caudado e putâmen) e no núcleo acumbens. Com relação ao hipocampo de ratos, foi observada uma quantidade moderada em toda formação hipocampal. Nas três espécies analisadas o tálamo apresentou grandes quantidades de 5-HT₇R. Por fim, vale destacar que nas três espécies estudadas, estruturas do tronco encefálico, como os núcleos da rafe e o colículo superior, foram classificadas como tendo de intermediária a elevadas concentrações de 5-HT₇R.

Dessa forma, devido à forte presença dos receptores 5-HT₇ em regiões associadas ao sistema límbico, como o hipocampo, este receptor provavelmente é responsável por mediar parte das respostas límbicas (GUSTAFSON et al., 1996, MARTÍN-CORA; PAZOS, 2004). Além disso, pesquisas recentes sugerem que este receptor esteja relacionado com a depressão, fazendo com que ele ganhe cada vez mais atenção (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004, MNIE-FILALI et al., 2011), uma vez que vários antidepressivos e antipsicóticos já conhecidos atuam sobre os receptores 5-HT₇ (HEDLUND, 2009, SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2010, STAHL, 2010, ROBERTS; HEDLUND, 2012).

Estudos mostraram que os receptores 5-HT₇ hipocampais estão íntima e complexamente envolvidos com o eixo HPA, de forma que, estudos comportamentais utilizando o modelo de estresse por imobilização, mostraram um aumento tanto em níveis de glicocorticóides, quanto na expressão de RNAm para receptores 5-HT₇ no hipocampo (YAU; NOBLE; SECKL, 2001). Além disso, também foi demonstrada uma relação positiva entre a ativação de receptores 5-HT₇ hipocampais e um aumento na expressão de receptores de glicocorticóides nesta estrutura (LAPLANTE; DIORIO; MEANEY, 2002).

De forma inversa, García-Iglesias et al. (2013), demonstraram que o bloqueio sistêmico de receptores 5-HT₇ é capaz de reduzir a secreção de corticosterona e do hormônio adrenocorticotrófico em ratos submetidos ao protocolo de estresse de restrição. Por fim, ao analisar a importância dos glicocorticóides para o funcionamento do sistema serotoninérgico central, Chaouloff (1995) propõe que os níveis basais de glicocorticóides exercem uma inibição tônica sobre a população de receptores de tipo 5-HT_{1A} do hipocampo. Essa relação entre o eixo HPA e o sistema serotoninérgico liga o estresse, os glicocorticóides e os receptores de tipo 5-HT₇, sugerindo que modulações nesses receptores podem

produzir efeitos antidepressivos e até mesmo atenuar respostas comportamentais relacionadas à eventos estressantes e aversivos (NANDAM; JHAVERI; BARTLETT, 2007, BONAVENTURE et al., 2011).

1.6 Modelos animais

Tendo em vista a importância de se estudar as vias, as estruturas e os mecanismos neurais relacionados à resposta ao estresse, bem como aos comportamentos de tipo ansioso e depressivo, os modelos animais se mostram essenciais para a compreensão dos processos neurofisiológicos, neuroanatômicos e neuropsicofarmacológicos envolvidos. Assim, diferentes modelos animais podem ser utilizados na investigação dos efeitos gerados por um fármaco no organismo e/ou dos substratos neurais envolvidos, bem como na investigação de hipóteses e de fármacos (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998). Dentre os principais modelos animais que envolvem a exposição à ambientes aversivos e à estressores inescapáveis, podemos destacar o nado forçado (proposto por Porsolt e colaboradores em 1977), o labirinto em cruz elevado (proposto por Pellow em 1985) e a restrição forçada seguida pelo teste no labirinto em cruz elevado (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000) ou no campo aberto (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985a).

1.6.1 Estresse de restrição seguido pelo labirinto em cruz elevado

O modelo de estresse de restrição foi proposto inicialmente para o estudo de úlceras gástricas, visto a relação de suas origens com estresse (MENGUY, 1960). Posteriormente, foi demonstrado que o estresse de restrição é capaz aumentar os níveis de corticosterona plasmática e este efeito perdurou por pelo menos 24 horas. Este mesmo efeito foi observado em cinco diferentes linhagens de ratos (PERHACH; BARRY, 1970). Animais que passaram por estresse de restrição crônico apresentaram adaptação ao estresse, de modo que os níveis plasmáticos de corticosterona retornaram ao normal (KEIM; SIGG, 1976). Os autores também constataram uma ativação massiva de AMPc na adrenal (>2000%) apenas enquanto a corticosterona se manteve aumentada. Também foi demonstrado uma redução na ingestão alimentar por até três dias após a restrição (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985a).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos de ansiedade mais utilizados em todo o mundo. Quando proposto, foi um modelo revolucionário para o estudo da ansiedade. Diferentemente dos modelos animais que eram utilizados até então, o LCE não necessita de protocolos que envolvam a privação de água ou comida e nem de estímulos aversivos prévios com o intuito de se condicionar medo ou ansiedade ao animal, sendo um protocolo simples, rápido e que envolve equipamentos de baixos custos. O LCE é um aparato constituído por dois braços abertos e dois braços fechados de

medidas iguais (50 x 50cm) que se cruzam perpendicularmente 50 cm acima do nível do solo, havendo uma plataforma central (10 x 10cm). Os braços abertos são cercados por uma barreira de *plexiglass*, de 1cm de altura, para evitar possíveis quedas dos animais, enquanto que os braços fechados são circundados por paredes de 40cm de altura (PELLOW et al., 1985).

Pellow et al. (1985) validaram as medidas clássicas para verificar o nível de ansiedade no LCE, através da análise dos comportamentos dos ratos, levando-se em conta o número de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos e fechados, mostrando também que os níveis plasmáticos de corticosterona estavam aumentados após a exposição dos animais aos braços abertos.

Desta forma, o uso do LCE se baseia no conflito gerado pela tendência natural de roedores em explorar locais novos e evitar situações potencialmente perigosas, ou seja, este comportamento é atribuído à aversão natural dos ratos aos braços abertos do aparato. Assim, por verificar um comportamento espontâneo e natural baseado na atividade exploratória do animal, não se fazem necessários testes posteriores para eliminar possíveis variáveis que poderiam alterar o comportamento (PELLOW et al., 1985). Também é assumido que os níveis de exploração exibidos por um animal no LCE é resultado de uma competição entre dois sistemas: um sistema exploratório que promove respostas investigatórias e um sistema de medo e ansiedade que inibe a exploração. Um princípio muito importante é o de que estes dois sistemas funcionam independentemente entre eles, dessa forma, um aumento na atividade exploratória pode ser resultado tanto da redução do sistema de medo e ansiedade quanto do aumento do sistema exploratório (PELLOW et al., 1985, WEISS et al., 1998).

Graeff et al., (1996) mostraram que animais que tiveram o NMR lesionado e passaram pelo procedimento de estresse de restrição desenvolveram mais úlceras gástricas do que os animais que tinha o NMR intacto, sugerindo que o mal funcionamento da via NMR-hipocampo dorsal é capaz de tornar os animais mais sensíveis a estressores. Dessa forma, apesar de ser um modelo animal para o estudo da ansiedade, o LCE é uma excelente ferramenta para avaliar os efeitos comportamentais da exposição a eventos estressores incontroláveis, uma vez que a pré-exposição ao estresse de restrição é capaz de intensificar a aversão natural que os roedores têm pelos braços abertos do LCE (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1992, PADOVAN; GUIMARÃES, 2000) e pelo campo aberto (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985a).

1.6.2 Nado forçado

O teste do nado forçado foi proposto como um novo modelo animal para estudo da depressão (POSOLT; PICHON; JALFRE, 1977). O teste consiste na pré-exposição do animal (15 minutos) dentro de

um cilindro com água e 24 horas depois o animal é colocado novamente no cilindro (5 minutos). O teste se baseia na premissa de que é impossível para o animal escapar do aparato com água e após um período inicial de vigorosa atividade física em busca de escape o animal reduz a atividade, realizando movimentos mínimos para se manter apenas com a cabeça acima do nível da água. Este comportamento é denominado de imobilidade. O comportamento de imobilidade é facilitado pelo pré-teste e o modelo foi validado pelos pesquisadores com o uso de antidepressivos entre a sessão pré-teste e teste, uma vez que estas drogas eram capazes de reduzir a imobilidade durante o teste.

Entretanto, autores já destacaram que apenas o comportamento de imobilidade pode falhar para detectar atividades antidepressivas, de forma que comportamentos ativos realizados pelo animal durante o teste também podem ser alterados por antidepressivos. Dentre os comportamentos ativos, destacam-se o nado a escalada e o mergulho (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). A latência para o primeiro episódio de imobilidade também pode ser utilizada como medida complementar de avaliação do comportamento tipo depressivo (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2009).

1.7 Hipótese

Dados anteriores de nosso laboratório (ALMEIDA et al., 2013) mostram que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no NMR é capaz de atenuar os efeitos da pré-exposição a eventos aversivos. Entretanto, esses efeitos não foram totalmente bloqueados pelo tratamento prévio com WAY100635, um antagonista seletivo de 5-HT_{1A} (FORSTER et al., 1995), pois embora o 8-OH-DPAT tenha sido descrito inicialmente como agonista de 5-HT_{1A} (ADELL et al., 1993, BOSKER et al., 1994, ADELL; ARTIGAS, 1998), este composto também apresenta afinidade pelo 5-HT₇ (BARD et al., 1993, LOVENBERG et al., 1993, RUAT et al., 1993, THOMAS et al., 1998, HOYER et al., 2002). Desta forma, parte das ações inicialmente descritas como sendo mediadas por receptores 5-HT_{1A}, podem ser na verdade, dependentes dos receptores 5-HT₇. Sugerindo que os receptores de 5-HT de tipo 5-HT₇ do NMR estejam envolvidos na modulação de comportamentos do tipo ansioso e depressivo.

Dessa maneira, considerando-se as evidências anteriormente apresentadas, a hipótese deste trabalho é que a atenuação e/ou prevenção das consequências do estresse sobre os comportamentos do tipo ansioso e depressivo possam ser mediadas por receptores 5-HT₇ do núcleo mediano da rafe.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se os receptores 5-HT de tipo 5-HT₇ do NMR estariam envolvidos na resposta comportamental a estressores incontroláveis em dois modelos animais: (1) um de ansiedade (estresse de restrição seguido pela exposição ao LCE) e (2) outro de depressão (nado forçado).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do estresse de restrição ou do pré-teste do NF gera efeito sobre a resposta comportamental no LCE ou NF respectivamente, 24 horas depois.

Avaliar se a manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente após o estresse de restrição ou do pré-teste do NF tem efeito sobre a resposta comportamental no LCE ou no NF 24 horas depois.

Avaliar se a manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do teste no LCE ou no NF, tem efeito sobre o comportamento de ratos que passaram previamente pelo estresse de restrição ou pelo pré-teste do NF, 24 horas antes.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 260 ratos machos da linhagem *Wistar* com aproximadamente sete semanas de idade e peso entre 280 e 330g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo do Campus Ribeirão Preto e mantidos por dois dias no biotério do referido laboratório para ambientação, sendo alocados aos pares e em caixas micro isoladoras de acrílico (35 x 19 x 25cm) forradas com serragem. O ambiente permaneceu em ciclo claro-escuro de doze horas com início do período claro às 6:30 am. e a temperatura foi mantida em 23+/-1 °C. Durante todo o período de experimentos os animais tiveram livre acesso à água e comida

Cada animal passou por um único protocolo experimental, eliminando, assim, qualquer possível viés comportamental relacionado à repetição de testes.

Vale destacar que os 260 animais mencionados fizeram parte dos meus experimentos ao longo do mestrado, porém, nesta dissertação estão presentes dados coletados no período de minha iniciação científica (processos FAPESP 2013/07773-5 e 2013/20.175-0), estando presentes dados de mais 142 animais.

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP – *campus* Ribeirão Preto e aprovado no processo 14.1.231.53.9.

3.2. Materiais Equipamentos e fármacos

3.2.1 Para a cirurgia estereotáxica:

- Aparelho estereotáxico (Stoelting);

Figura 2: aparelho estereotáxico utilizado nas cirurgias para implantação de cânula.

- Cânulas guia de aço inox (14 mm) com um nó de fio metálico soldado a 4 mm de uma das pontas para facilitar a fixação da cânula ao capacete de acrílico;
- Cimento acrílico de uso odontológico para moldagem da prótese utilizada para proteção do crânio e fixação da cânula guia;
- Pequenos parafusos (usados em armação de óculos) para auxiliar na fixação do capacete de acrílico;
- Mandris de aço inox (14 mm) para impedir o entupimento da luz da cânula e evitar o contato do tecido vivo com o meio externo;
- Álcool 70% para limpeza dos parafusos, cânulas e mandris.
- Instrumentos cirúrgicos (pinça, tesoura, bisturi e espátula);
- Mini-retífica para perfuração óssea (Dremel);
- Anestésico geral 2, 2, 2-tribromoetanol a 2,5% (Sigma-Aldrich, 250mg/kg, a 10ml/kg; i.p.) diluído em água destilada;
- Solução hidroalcoólica de iodo 2% para limpeza e desinfecção da região da cirurgia e dos pontos de injeção;
- Anestésico local cloridrato de lidocaína (Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,2mg/ml, a 0,2ml/animal; s.c.) associado a vasoconstritor noradrenalina 0,04%;
- Anti-inflamatório, analgésico e antitérmico flunixin meglumina, 5mg/ml (Banamine Injetável; Schering-Plough; 2,5mg/kg, a 1ml/kg de peso corporal; s.c.);
- Associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fort Dodge, 240.000 UI; 0,2ml/animal; i.m.) diluída em água destilada.

Todo o material metálico utilizado é inoxidável e foi limpo e desinfetado com álcool 70% antes e depois dos procedimentos adotados.

3.2.2 No procedimento de restrição forçada:

- Gaiolas de aço inox (20 cm x 6,5 cm x 3 cm), com teto removível e ajustável (figura 3).
- Fita adesiva para ajudar a fixar o teto da gaiola.

Figura 3: gaiola de contenção utilizada para restrição forçada.

3.2.3 Para os experimentos de injeção intra-NMR:

- Agulhas gengivais (BD Precision Glide 0,60 x 25 23G1) (15 mm) para injeção intracerebral;
- Segmentos de polietileno;
- Seringas Hamilton de 10ul;
- Bomba de infusão para administração central (Insight e KdScientific);
- Antagonista de 5-HT₇ SB-258741 (SB; AXON MEDCHEM);
- Agonista de 5-HT₇ LP-44 (LP; Sigma-Aldrich);
- Solução salina à 0,9%.

As doses que foram utilizadas tanto do agonista, quanto do antagonista de 5-HT₇, foram definidas em estudo piloto através da curva dose-resposta para cada um dos fármacos, e foram baseadas em dados da literatura (MONTI et al., 2008). Neste trabalho, Monti et al. (2008), realizaram um estudo com injeções intra-NDR tanto com o agonista LP-44, quanto com o antagonista SB-269970. Desta forma, por meio de um estudo que levamos em consideração a proporção de neurônios serotoninérgicos entre o NDR e o NMR, foram definidas as três doses utilizadas do LP-44 na curva dose-resposta. E por meio de um estudo de equivalência de potência entre os antagonistas também foi possível definir quais as doses do SB-258751 seriam utilizadas. Portanto, as doses utilizadas na curva dose-resposta para o agonista (LP-44) foram 0,1; 0,3 e 1,0 nmol/0,2μL, enquanto que para o antagonista (SB-258741) foram 0,03; 0,1 e 0,3 nmol/0,2μL.

3.2.4 Para o teste do labirinto em cruz elevado:

- Um labirinto em cruz elevado (LCE) (figura4);
- Uma câmera filmadora localizada acima do LCE para filmar o comportamento dos animais e transmitir a informação gravada para um computador para posterior análise comportamental.

- Álcool 70% e papel higiênico para limpeza do labirinto após o teste comportamental de cada rato.

Figura 4: Labirinto em Cruz Elevado.

3.2.5 Para o teste no nado forçado (NF):

Foi utilizado um cilindro de acrílico (30 cm de diâmetro; 50 cm de altura) preenchido com aproximadamente de 30cm de água à 24 ± 1 °C (figura 5).

Uma câmera filmadora localizada à aproximadamente 1,5m do cilindro. A câmera permaneceu conectada a um computador para filmagem e posterior análise comportamental.

Figura 5: Aparato utilizado no teste do nado forçado.

3.2.6 Para o procedimento de perfusão:

- Tubos de látex com 5 mm de espessura para a montagem do sistema de perfusão por gravidade (solução à 70 cm de altura);

- Uma agulha ligada ao tubo de látex para injeção das soluções no organismo do animal;
- Guilhotina (Bonter Equipamentos) para a retirada da cabeça do animal;
- Instrumentos cirúrgicos (pinças, tesouras, espátula e alicate);
- Uretana 25% (Sigma-Aldrich, 1,25g/kg, a 10ml/kg; i.p.) diluída em água destilada;
- Solução salina 0,9%;
- Solução de formaldeído 10%.

3.2.7 Para preparação e análise do material histológico:

- Solução de sacarose 30%, preparada a partir de PBS 0,1M, para crioproteção do encéfalo;
- Aparelho criostato (Leica, modelo Cryocut 1.800) para preparação dos cortes histológicos;
- Lâminas de vidro (Precision Glass Line 26,0 x 76,0mm);
- Pincéis para manuseio do tecido cortado;
- Microscópios (Leica DM5500 e Zeiss JENAMED 2) para análise do sítio de injeção dos cortes histológicos.

3.3. Procedimentos experimentais

Ao chegar ao biotério do laboratório, os animais foram alojados em duplas e colocados em caixas forradas com serragem, com livre acesso à água e comida. Após o período de ambientação, de aproximadamente 48 horas, eles foram submetidos aos procedimentos experimentais descritos a seguir.

3.3.1 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia

Primeiramente, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia direcionada ao NMR. Para tanto, os animais foram anestesiados com 2, 2, 2-tribromoetanol e depois foi realizada a tricotomia na região da cabeça. Os animais foram fixados no aparelho estereotáxico através do rochedo temporal e dos incisivos superiores, com a barra dos incisivos -3,3 mm abaixo da linha interaural. Após isso, foi feita a limpeza com álcool iodado da região a ser realizada a cirurgia e das regiões onde o animal receberia as injeções. Foram administrados o cloridrato de lidocaína associado a vasoconstritor (Novocol 100; s.c.), o anti-inflamatório, analgésico e antitérmico flunixinameglumina 5mg/ml (Banamine Injetável; s.c.) e a associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico; i.m.). Após a administração desses medicamentos, foi realizada uma incisão longitudinal, expondo o crânio e removendo o periósteo por raspagem. Com a mini-retífica,

foram abertos três orifícios no crânio, sendo um deles para a incisão da cânula, através da qual a agulha será direcionada para a injeção intra-NMR, de acordo com as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (1986) (ântero-posterior: -7,3; lateralidade: 2,7; profundidade: -7,8; inclinação da haste: 18 graus). Os outros dois orifícios foram utilizados para a implantação de dois parafusos que auxiliam na fixação da prótese de acrílico. Após o término da cirurgia, os animais permaneceram em um ambiente aquecido até retomarem os sentidos. Depois, foram levados ao biotério em suas respectivas caixas para que se recuperarem durante o período de uma semana com livre acesso à água e comida.

3.3.2 Restrição forçada

Gaiolas de aço inox (25cm x 7cm x 5cm), com teto removível e ajustável (figura 3) foram utilizadas para limitar os movimentos dos ratos por duas horas. Após este período, os animais foram levados de volta às suas caixas no biotério. Todos os experimentos de restrição forçada tiveram início entre 8:00 e 9:00 horas da manhã.

Em todas as condições estudadas a restrição forçada foi realizada de forma aguda, com duração de duas horas, 24 horas antes do teste no LCE.

3.3.3 Injeção intra-NMR

Cada animal recebeu duas injeções intra-NMR de acordo com a condição experimental (como representado na figura 6). As injeções foram realizadas por meio de uma bomba de infusão para administração central programada para injetar 0,2µL em 30 segundos. A bomba de infusão é ligada a um sistema de tubos de polietileno, o qual apresenta em uma das extremidades a agulha gengival (15 mm) que é inserida na cânula-guia, enquanto que na outra extremidade encontra-se a seringa Hamilton (10ul) que tem seu embolo controlado pela bomba de infusão.

As injeções intracerebrais realizadas foram de Salina (0,2µL), LP-44 (0,3 nmol/0,2µL) e/ou SB-258741 (0,1 nmol/0,2µL) e houve um intervalo de cinco minutos entre cada injeção e cinco minutos após a segunda injeção os animais foram testados.

Vale ressaltar que as doses utilizadas foram determinadas por meio de um estudo prévio no qual foi realizada uma curva dose-resposta para cada fármaco.

Figura 6: Esquema representativo do momento das intervenções farmacológicas intra-NMR para as cinco condições experimentais estudadas. As setas representam o momento em que ocorreram as injeções intra-NMR em relação ao estresse: imediatamente antes da restrição (1), imediatamente depois da restrição (2), e imediatamente antes do teste no LCE (4). Duas condições controles foram realizadas, uma com injeção 24 horas antes do teste (3) e outra com injeção imediatamente antes do teste (5), ambas sem exposição ao estressor.

3.3.4 Teste no labirinto em cruz elevado (LCE)

Os animais foram retirados de suas caixas do biotério e colocados separadamente em caixas menores utilizadas para o transporte até a sala do LCE. Os ratos foram colocados no aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados.

Uma câmera fixada acima do labirinto e acoplada a um computador filmou os ratos por 5 minutos para posterior análise comportamental. Para as análises foram contabilizadas as frequências de entradas em ambos os braços do LCE (abertos e fechados), bem como o tempo dispendido em cada braço do aparato.

Após o teste de cada animal, o LCE foi limpo e com álcool 70%. Os testes no LCE foram realizados em uma sala com luminosidade (25lux), temperatura (23+/- 1 °C) e som controlados e foram conduzidos entre 8:00 e 11:00 horas.

3.3.5 Teste do Nado Forçado (NF)

Os animais foram retirados de suas caixas do biotério e colocados separadamente em caixas menores utilizadas para o transporte até a sala do aparato do NF. O modelo consiste em colocar os animais para nadar por um período de 15 minutos (pré-teste). Ao final do pré-teste os animais foram retirados do aparato e secados para então retornarem à suas caixas no biotério. 24 horas depois, os animais foram submetidos a uma nova sessão do NF, desta vez de 5 minutos (teste) e tiveram seus comportamentos filmados para posterior análise.

Os parâmetros comportamentais analisados foram o tempo de imobilidade, bem como a latência para o primeiro episódio de imobilidade, o tempo e a frequência de escalada e o tempo e a

frequência de mergulhos (na literatura é comum encontrar os comportamentos de escalada e mergulho apenas em suas terminologias em inglês, *climbing* e *diving*, respectivamente).

Os testes foram realizados em uma sala com som e temperatura controlados e sempre entre as 8:00 e 11:00 horas.

3.3.6 Perfusão transcardíaca

Terminado o teste no LCE ou no NF, os ratos foram anestesiados com uretana 25% (i.p.) para a realização da perfusão com solução salina 0,9% e solução de formaldeído 10%.

Para o procedimento de perfusão (figura 7), os animais tiveram as cavidades abdominais e torácicas expostas. Uma agulha, ligada ao aparato de tubos de látex e a uma bomba peristáltica foi inserida no ventrículo esquerdo e a aurícula direita foi rompida com uma tesoura, afim de se trocar a solução sanguínea do animal por solução salina e, posteriormente a isso, esta solução foi substituída por solução de formaldeído 10%.

Por fim, os animais foram decapitados com a guilhotina e o encéfalo foi removido e colocados por duas horas em solução de formaldeído 10% para pós fixação. Após este período, os encéfalos foram transferidos para solução de sacarose 30% por aproximadamente 48 horas para crioproteção. A crioproteção se dá devido perda de água do tecido por difusão para a solução de sacarose altamente concentrada. A perda de água pode ser verificada pela decantação do tecido na solução.

Figura 7: esquema representativo das etapas envolvidas no procedimento de perfusão transcardíaca e remoção do encéfalo.

3.3.7 Análise histológica

Após o final do processo de crioproteção em solução de sacarose, os encéfalos foram congelados para a realização dos cortes histológicos, em secções de 40 μ m, em um criostato. Os cortes foram montados em lâminas para verificação dos sítios de injeções no microscópio. Foram levados em consideração na análise estatística apenas os animais que tiveram o sítio de injeção confirmados no NMR.

3.3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7.02.

Para a frequência de entradas nos braços fechados (FF) foi utilizada a média do valor bruto do total de entradas nos braços fechados para os diferentes grupos de acordo com a droga. A frequência de entrada (FA) e o tempo nos braços abertos (TA) foram transformados em porcentagem, seguindo os mesmos parâmetros de divisão de grupos, de acordo com o cálculo: FA ou TA divididos pelo total de entradas (FA+FF) ou tempo total (TA+TF) multiplicados por 100, como representado nas fórmulas abaixo.

$$\%FA = 100 \times [FA / (FA + TA)]$$

e

$$\%TA = 100 \times [TA / (TA + TF)];$$

sendo:

FA = frequência de entrada nos braços abertos;

FF = frequência de entrada nos braços fechados;

TA = tempo despendido nos braços abertos;

TF = tempo despendido nos braços fechados.

Após o cálculo das FF, %FA e %TA, os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (oneway ANOVA), seguida pelo teste pós-hoc de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 0,05.

Para os comportamentos de tempo de imobilidade (TI), latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI), frequência e tempo de escalada (FE; TE) e mergulho (FM; TM) foram calculados os valores brutos de cada parâmetro. Estes valores foram submetidos à ANOVA de uma via seguida pelo pós teste de Tuley. Novamente o nível de significância adotado foi 0,05.

4. Estudos comportamentais

4.1 Curva dose-resposta – Efeitos de diferentes doses de LP-44 ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos *naive* submetidos ao teste no LCE.

Inicialmente foi necessário realizar uma curva dose-resposta para o agonista (LP-44) e para o antagonista (SB-258741), uma vez que não se tem estudos de injeções intra-NMR destes fármacos. Como já citado, as doses foram escolhidas com base na literatura (MONTI et al., 2008) (tabela 1).

Os animais passaram pelo período de ambientação de dois dias e depois foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia ao NMR. Após o período de recuperação de aproximadamente uma semana, os animais foram submetidos ao teste no LCE. Imediatamente antes do teste foram realizadas as duas injeções intra-NMR, a primeira delas dez minutos antes da exposição ao LCE e a segunda cinco minutos antes.

Após o teste os animais foram submetidos ao procedimento de perfusão transcardíaca para remoção do encéfalo e sua posterior crioproteção em solução de sacarose. Por fim, foram realizados cortes histológicos para verificação do sítio de injeção.

Tabela 1: divisão dos sete tratamentos farmacológicos utilizados na curva dose-resposta do agonista (LP-44) e antagonista (SB-258741) de 5-HT7 intra-NMR.

Primeira injeção	Segunda injeção
salina	Salina
salina	LP-44 0,1nmol
salina	LP-44 0,3 nmol
salina	LP-44 1,0nmol
SB-258741 0,03nmol	Salina
SB-258741 0,1 nmol	Salina
SB-258741 0,3nmol	Salina

Análises posteriores (ver discussão) nos levaram a selecionar a dose intermediária de cada fármaco utilizado na curva dose-resposta para dar sequência aos experimentos, tanto para os experimentos utilizando o LCE, quanto os do nado forçado. Para o agonista (LP-44), foi selecionada a dose de 0,3nmol e para o antagonista (SB-258741), a dose de 0,1nmol. A tabela 2 indica os tratamentos farmacológicos selecionados.

Vale destacar que esta condição experimental fez parte do meu trabalho de iniciação científica no Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, sob orientação da profa. Dra. Cláudia Maria Padovan (processo FAPESP nº 2013/07773-5).

Tabela 2: divisão dos tratamentos farmacológicos utilizados no protocolo de estresse de restrição seguido pela exposição no LCE e no teste do nado forçado.

Primeira injeção	Segunda injeção
Salina	Salina
Salina	LP-44 0,3 nmol
SB-258741 0,1 nmol	Salina
SB-258741 0,1 nmol	LP-44 0,3 nmol

4.2 Restrição forçada seguida pelo LCE

4.2.1 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do estresse de restrição:

Nesta primeira condição, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Após o período de recuperação de aproximadamente uma semana, os ratos foram submetidos ao estresse de restrição forçada. O tratamento farmacológico foi realizado imediatamente antes do estresse de restrição (figura 8). Os ratos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento intra-NMR que receberam (tabela 2). Como já descrito, os animais receberam duas injeções intra-NMR e foram submetidos ao estresse de restrição de duas horas. No dia seguinte estes animais foram submetidos ao teste comportamental no LCE e tiveram seus comportamentos filmados para posterior análise comportamental. Posteriormente a isso passaram pelo procedimento de perfusão transcardíaca e remoção do encéfalo para crioproteção e análises histológicas, como já descrito.

Figura 8: Esquema representativo do protocolo de estresse de restrição seguido pelo LCE com manipulação dos receptores 5-HT₇ imediatamente antes da restrição. A seta representa o momento em que ocorreram as intervenções farmacológicas intra-NMR (imediatamente antes da restrição forçada, condição 1). As 24 horas indicam o tempo entre o estresse de restrição e o teste comportamental no LCE.

4.2.2 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente depois do estresse de restrição:

Nesta condição os procedimentos adotados foram os mesmos da anterior, porém com a diferença no momento da intervenção farmacológica. Desta vez as injeções intra-NMR ocorreram imediatamente após o evento de restrição forçada (figura 9). Os demais procedimentos se mantiveram os mesmos.

Figura 9: Esquema representativo do protocolo de estresse de restrição seguido pelo LCE com manipulação dos receptores 5-HT₇ imediatamente depois da restrição. A seta representa o momento em que ocorreram as intervenções farmacológicas intra-NMR (imediatamente depois da restrição forçada, condição 2). As 24 horas indicam o tempo entre o estresse de restrição e o teste comportamental no LCE.

4.2.3 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR 24 horas antes do LCE na ausência do estresse de restrição (condição controle):

Esta condição experimental é a condição controle das duas anteriores. Nela os animais com cânula direcionada ao NMR não foram expostos ao estresse de restrição (figura 10) e a intervenção farmacológica ocorreu 24 horas antes do teste no LCE. Os demais procedimentos foram os mesmos.

Figura 10: Esquema representativo do protocolo controle com manipulação dos receptores 5-HT₇ 24 horas antes do LCE na ausência do estresse de restrição. A seta representa o momento em que ocorreram as intervenções farmacológicas intra-NMR (24 horas antes do teste no LCE, condição 3). Nesta condição experimental não há o procedimento de restrição forçada. As 24 horas indicam o tempo entre as injeções intra-NMR e o teste comportamental no LCE.

4.2.4 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do teste no LCE e 24 horas após o estresse de restrição:

Nesta condição experimental (figura 11) os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica e após recuperação foram submetidos ao estresse de restrição. Após este procedimento, os animais foram levados de volta às suas caixas no biotério. 24 horas depois, os animais receberam o tratamento farmacológico intra-NMR e foram colocados no LCE e tiveram seus comportamentos filmados para posterior análise comportamental. Novamente, os procedimentos seguintes ao teste foram iguais aos já descrito.

Figura 11: Esquema representativo do protocolo de estresse de restrição seguido pelo LCE 24 horas depois com manipulação dos receptores 5-HT₇ imediatamente antes do teste. A seta representa o momento em que ocorreram as intervenções farmacológicas intra-NMR (imediatamente antes do teste no LCE, condição 4). As 24 horas indicam o tempo entre o estresse de restrição e o teste comportamental no LCE.

4.2.5 Manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do teste LCE na ausência do estresse de restrição (condição controle):

Esta condição controle foi realizada com animais não expostos ao estresse de restrição (figura 12). Vale ressaltar que, a fim de minimizar o número de animais utilizados nos experimentos, nesta condição experimental foram utilizados os dados da curva dose-resposta para três dos quatro grupos, desta condição. Como os procedimentos adotados nestas duas condições são os mesmos, os dados referentes ao grupo controle (Salina+Salina), ao grupo tratado apenas com agonista de 5-HT₇, LP-44 (Salina+LP-44), e ao grupo tratado apenas com o antagonista de 5-HT₇, SB-258741 (SB-258741+Salina) foram reutilizados dos dados da curva dose-resposta, sendo realizados novos experimentos apenas para acrescentar o grupo tratado com ambas as drogas (SB-258741+LP-44) e aumentar possíveis *n* experimentais. Lembrando que os dados reutilizados são referentes às doses selecionadas de cada droga, 0,3 nmol para o LP-44 e 0,1 nmol para o SB-258741.

Figura 12: Esquema representativo do protocolo controle com manipulação dos receptores 5-HT₇ imediatamente antes do LCE na ausência do estresse de restrição. A seta representa o momento em que ocorreram as intervenções farmacológicas intra-NMR (imediatamente antes do teste no LCE, condição 5). As 24 horas indicam a janela temporal na qual deveria ter ocorrido o estresse de restrição, porém nesta condição experimental não há o procedimento de restrição forçada, apenas o teste comportamental.

4.3 Nado forçado

4.3.1 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do pré-teste do NF:

Nesta condição experimental, os animais passaram pelo procedimento de cirurgia estereotáxica e após o período de recuperação de aproximadamente uma semana, os ratos foram submetidos à sessão pré-teste do NF.

O tratamento farmacológico foi realizado imediatamente antes do pré-teste (figura 13). Os ratos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento intra-NMR que receberam (tabela 2). Após as injeções os ratos foram submetidos ao pré-teste de 15 minutos. No dia seguinte estes animais foram submetidos ao teste do NF (5 minutos) e foram filmados para análise comportamental. Posteriormente a isso passaram pelo procedimento de perfusão transcardíaca e remoção do encéfalo para crioproteção e análise histológica.

Figura 13: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H₇ imediatamente antes do pré-teste. A seta representa o momento em que ocorreram as injeções intra-NMR (imediatamente antes da sessão pré-teste do NF, condição 1). As 24 horas indicadas é o tempo entre o pré-teste e o teste comportamental do NF.

Vale destacar que esta condição experimental fez parte do trabalho de iniciação científica da aluna Fabiana Maria das Graças Corsi Zuelli durante seu período de estágio no Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, sob orientação da profa. Dra. Cláudia Maria Padovan (processo FAPESP nº 2013/20.175-0).

4.3.2 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H₇ do NMR imediatamente depois do pré-teste do NF:

Os procedimentos adotados nesta condição experimental são os mesmos da condição anterior, com diferença para o momento da intervenção farmacológica (figura 14). Nesta condição a intervenção ocorreu imediatamente após a sessão pré-teste do NF.

Figura 14: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H₇ imediatamente depois do pré-teste. A seta representa o momento em que ocorreram as injeções intra-NMR (imediatamente depois da sessão pré-teste do NF, condição 2). As 24 horas indicadas é o tempo entre o pré-teste e o teste comportamental do NF.

4.3.3 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H₇ do NMR 24 horas antes da sessão teste sem exposição ao pré-teste do NF (condição controle):

Nesta condição experimental controle das duas anteriores, os animais também passam pelo procedimento de cirurgia estereotáxica, porém após a recuperação, não houve a exposição ao pré-teste antes do teste (figura 15). Assim, a intervenção farmacológica ocorreu 24 horas antes da sessão teste do NF.

Figura 15: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H₇ 24 horas antes do teste, sem exposição ao pré-teste. A seta representa o momento em que ocorreram as injeções intra-NMR (24 horas antes da sessão teste do NF, condição 3). Nesta condição controle não há a exposição ao pré-teste. As 24 horas indicadas é o tempo entre as injeções e o teste comportamental do NF.

Vale destacar que parte desta condição controle também fez parte do trabalho de iniciação científica da aluna Fabiana Maria das Graças Corsi Zuelli durante seu período de estágio no Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão, sob orientação da profa. Dra. Cláudia Maria Padovan (processo FAPESP nº 2013/20.175-0). Nesta condição, durante meu mestrado, apenas foi aumentado o número de animais por tratamento (*n* experimental).

4.3.4 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H₇ do NMR imediatamente antes da sessão teste do NF e 24 horas depois do pré-teste:

Nesta condição experimental, os animais foram submetidos à estereotaxia e após a recuperação foram expostos ao pré-teste do NF. 24 horas depois os animais receberam as injeções intra-NMR e logo depois foram expostos à sessão teste do NF (figura 16).

Figura 16: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H₇ imediatamente antes do teste e 24 horas depois do pré-teste. A seta representa o momento em que ocorreram as injeções intra-NMR (imediatamente antes da sessão teste do NF, condição 4). As 24 horas indicadas é o tempo entre o pré-teste e o teste comportamental do NF.

4.3.5 Manipulação farmacológicas dos receptores 5-H₇ do NMR imediatamente antes da sessão teste do NF sem exposição prévia ao pré-teste (condição controle):

Nesta condição controle os animais passaram pelos mesmos procedimentos que na condição anterior, porém desta vez não houve a exposição ao pré-teste (figura 17).

Figura 17: Esquema representativo do protocolo do nado forçado com manipulação dos receptores 5-H₇ imediatamente antes do teste sem exposição prévia ao pré-teste. A seta representa o momento em que ocorreram as injeções intra-NMR (imediatamente antes da sessão teste do NF, condição 5). Nesta condição não há exposição ao pré-teste. As 24 horas indicadas é o tempo entre onde deveria ocorrer a sessão pré-teste e o teste comportamental no NF.

5. Resultados

5.1 Histologia

A figura 18 representa os sítios de injeções confirmados para o NMR. Desta forma, ratos que não tiveram o sítio de injeção confirmado não foram considerados na análise estatística.

Figura 18: Sítios de injeção confirmados para o núcleo mediano da rafe. As pranchas contendo representações esquemáticas de cortes coronais do cérebro de ratos foram retiradas do atlas de Paxinos e Watson (1986). O número de pontos indicados nas pranchas é menor que o número de animais, devido à sobreposição de pontos.

Os dados do referentes aos experimentos do LCE estão representados na forma das médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) da frequência de entradas nos braços fechados (FF), da porcentagem da frequência de entradas nos braços abertos (%FA) e da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA) em relação ao total.

Os resultados correspondentes aos experimentos do NF estão representados na forma de médias $\pm$ EPM do tempo total de imobilidade (TI), da latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI), da frequência e tempo de escalada (FE; TE) e da frequência e tempo de mergulho (FM; TM).

5.2 Curva dose-resposta

A figura 19 mostra os resultados obtidos na curva dose-resposta das drogas utilizadas.

Não foram encontradas diferenças significativas após o tratamento com as diferentes doses de SB-258741 e/ou LP-44 administrados no NMR de ratos imediatamente antes do teste no LCE. Especificamente, na FF ($F_{7,65}=0,82$; $p>0,05$) não houve alteração com nenhuma das diferentes doses desses compostos nas entradas dos braços fechados, quando comparadas com o grupo controle. Da mesma forma, as análises da atividade exploratória dos braços abertos, %FA ($F_{7,65}=0,28$; $p>0,05$) e %TA ($F_{7,65}=0,68$; $p>0,05$) também não indicaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Como nenhuma das doses utilizadas dos dois compostos alterou o padrão de exploração dos ratos no LCE, foram selecionadas, para as etapas seguintes, a dose de cada droga que mais se assemelhou ao padrão do grupo controle, sendo estas a dose intermediária de cada composto (LP-44 0,3 nmol e SB-258741 0,1 nmol).

Figura 19: Ausência de efeito do LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT₇, respectivamente), administrados no NMR de ratos, sobre a atividade exploratória no LCE na ausência de um evento estressor prévio. No painel superior são apresentadas as médias $\pm$ EPM (erro padrão das médias) das frequências de entradas nos braços fechados (FF; barras cinzas) dos diferentes grupos experimentais. No painel inferior estão representadas as médias $\pm$ EPM das porcentagens de entrada (%FA; barras brancas) e tempo (%TA; barras pretas) nos braços abertos em relação ao total. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em relação ao controle (salina+salina) (ANOVA de uma via seguida de Duncan). Os números apresentados nas barras indicam o número de animais por grupo.

5.3 Restrição forçada seguido pelo LCE

5.3.1 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do estresse de restrição sobre a atividade exploratória no LCE 24 horas depois:

A figura 20 mostra os resultados obtidos nesta condição experimental.

Ao analisar a %TA ($F_{3,33}=9,74$; $p<0,05$), a ANOVA mostrou que há diferença entre os grupos. Desta forma, um teste post hoc de Tukey foi realizado e este mostrou uma única diferença entre os tratamentos. O grupo tratado com LP-44 (salina + LP = $20,05 \pm 3,52$) apresentou uma %TA superior ao tratamento controle (salina + salina = $4,65 \pm 1,36$), ao SB-258741 (SB + salina = $8,01 \pm 1,51$) e ao SB+LP ($6,31 \pm 1,69$). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre eles.

Com relação a %FA ($F_{3,33}=9,74$; $p<0,05$) a ANOVA mostrou que há diferença entre os grupos. O teste post hoc foi realizado, mostrando que o tratamento com LP-44 (salina + LP = $31,78 \pm 2,97$) foi capaz de aumentar a %FA, quando comparado ao tratamento controle (salina + salina = $11,12 \pm 3,02$), ao tratamento com SB-258741 (SB + salina = $20,60 \pm 1,86$) e ao tratamento com ambas as drogas (SB + LP = $15,68 \pm 3,45$). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,33}=0,372$; $p>0,05$) para a variável FF.

Injeção + restrição → LCE

Figura 20: Administração de LP-44, mas não de SB-258741, no NMR imediatamente antes estresse de restrição impede as manifestações comportamentais resultantes do estresse 24 horas depois no LCE. Estão representadas as médias $\pm$ EPM da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA; painel A), da porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA; painel B) e das frequências de entradas nos braços fechados (FF; painel C). O asterisco (*) representa diferença com relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.5.2 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente depois do estresse de restrição sobre a atividade exploratório no LCE 24 horas depois:

Na figura 21 estão representados os resultados desta condição experimental.

A ANOVA mostrou diferença entre os grupos com relação à %TA ($F_{3,33}=8,28$; $p<0,05$). O pós teste de Tukey evidenciou diferença para o tratamento com LP-44 (salina + LP-44 = $16,01 \pm 2,44$), de modo que ele foi capaz aumentar significativamente a %TA quando comparado ao tratamento controle (salina + salina = $4,29 \pm 1,70$), ao tratamento com SB-258741 (SB + salina = $6,36 \pm 1,47$) e ao tratamento com ambas as drogas (SB+LP = $8,75 \pm 1,18$).

Ao analisar a %FA, a ANOVA também mostrou que há diferenças entre os grupos ($F_{3,33}=4,29$; $p<0,05$). O pós teste de Tukey evidenciou que o tratamento com LP-44 (LP + salina = $27,68 \pm 2,63$) aumentou significativamente a %FA quando comparado aos animais salina ($14,79 \pm 4,31$). Nesta condição, o tratamento com antagonista previamente ao agonista (SB+LP= $27,83 \pm 3,04$) não foi capaz de impedir o efeito do agonista de aumentar a frequência de exploração dos braços abertos.

Com relação a FF, não houve diferenças estatísticas entre os grupos ($F_{3,33}=2,08$; $p>0,05$).

Restrição + injeção → LCE

Figura 21: Administração de LP-44 no NMR imediatamente após o estresse de restrição impede as manifestações comportamentais resultantes do estresse 24 horas depois no LCE. A administração prévia ao agonista do antagonista, não é capaz de bloquear totalmente os efeitos do LP-44. Estão representadas as médias $\pm$ EPM da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA; painel A), da porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA; painel B) e das frequências de entradas nos braços fechados (FF; painel C). O asterisco (*) representa diferença com relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.3.3 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR sobre a atividade exploratório no LCE 24 horas depois (condição controle):

Na figura 22 estão representados os resultados obtidos nesta condição experimental controle das duas anteriores com as injeções intra-NMR 24 horas antes do teste no LCE.

Nesta condição não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à %TA ($F_{3,41}=0,18$; $p>0,05$). A ANOVA também não mostrou diferença entre os grupos com relação a %FA ($F_{3,41}=0,44$; $p>0,05$).

Da mesma forma, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos com relação à FF ($F_{3,41}=0,54$; $p>0,05$).

Controle: injeção → LCE

Figura 22: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no NMR de ratos sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado 24 horas depois. Estão representadas as médias $\pm$ EPM da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA; painel A), da porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA; painel B) e das frequências de entradas nos braços fechados (FF; painel C). Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.3.4 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR de ratos previamente estressados sobre o comportamento no LCE imediatamente após a manipulação:

A figura 23 mostra os resultados dos animais que foram expostos ao estresse de restrição e 24 horas depois receberam o tratamento intra-NMR e foram testados no LCE imediatamente depois.

A ANOVA referente à %TA indicou diferenças entre os grupos ($F_{3,32}=8,97$; $p<0,05$). O grupo tratado com LP-44 (salina + LP = $29,87 \pm 5,40$) apresentou uma maior %TA em relação ao tratamento controle (salina + salina = $6,04 \pm 1,90$), ao tratamento com SB-258741 (SB + salina = $9,79 \pm 3,52$) e ao tratamento com ambas as drogas (SB + LP = $10,47 \pm 2,58$). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças com relação a %TA.

Com relação à %FA, a ANOVA mostrou diferenças significativa entre os grupos ($F_{3,32}=12,36$; $p<0,05$). Os animais tratados com LP-44 (salina + LP = $42,79 \pm 4,40$) apresentaram uma %FA significativamente maior quando comparados aos controles (salina + salina = $13,02 \pm 3,57$), aos tratados com SB (SB + salina = $13,33 \pm 4,94$) e aos tratados com as duas drogas (SB + LP = $18,87 \pm 3,63$).

Diferentemente, dos dois parâmetros analisados até então, a ANOVA de uma via não indicou diferença significativa entre os grupos quanto à FF ($F_{3,32}=0,81$; $p>0,05$).

Figura 23: Administração de LP-44 no NMR de ratos 24 horas após o estresse de restrição bloqueia as manifestações comportamentais do estresse no LCE quando testados imediatamente após o tratamento. Estão representadas as médias $\pm$ EPM da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA; painel A), da porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA; painel B) e das frequências de entradas nos braços fechados (FF; painel C). O asterisco (*) representa diferença com relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.3.5 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do teste no LCE (condição controle):

A figura 24 mostra os resultados dos experimentos nos quais os animais não estressados receberam os diferentes tratamentos intra-NMR imediatamente antes do teste no LCE.

A ANOVA não indicou nenhuma diferença significativa com relação à %FA ($F_{3,350}=1,00$; $p>0,05$) e com a %TA ($F_{3,35}=0,18$; $p>0,05$) entre os grupos.

Da mesma forma, a ANOVA não indicou diferença significativa entre os grupos com relação à FF ($F_{3,35}=0,79$; $p>0,05$).

Controle: injeção + LCE

Figura 24: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no NMR de ratos imediatamente antes do teste no LCE sobre a atividade exploratória do animal. Estão representadas as médias $\pm$ EPM da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA; painel A), da porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA; painel B) e das frequências de entradas nos braços fechados (FF; painel C). Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.3.6 – Validação do protocolo experimental do estresse de restrição seguido pelo LCE

Com a finalidade de demonstrar o bom funcionamento do modelo experimental empregado, foi realizada uma comparação (ANOVA de uma via seguida pelo pós teste de Tukey) entre os tratamentos controles (salina+salina) das cinco condições experimentais realizadas. Desta forma, é possível isolar a variável “estresse”, uma vez que os tratamentos intra-NMR são iguais em todas as condições comparadas aqui. Assim, é possível demonstrar que o estresse por si só é capaz de reduzir a exploração dos braços abertos (figura 25). Os números das condições experimentais indicados estão de acordo com a figura 6.

A ANOVA indicou diferenças entre os grupos tanto para a %TA ($F_{4,48}=7,04$; $p>0,05$), quanto para a %FA ($F_{4,48}=6,57$; $p<0,05$), porém não para a FF ($F_{4,48}=1,56$; $p>0,05$).

As três condições experimentais com exposição ao estresse apresentaram as menores explorações dos braços abertos, tanto em %FA (1 = $11,12 \pm 3,02$; 2 = $14,79 \pm 4,31$; 4 = $13,02 \pm 3,57$), quanto em %TA (1 = $4,65 \pm 1,36$; 2 = $4,29 \pm 1,70$; 4 = $6,04 \pm 1,90$). Como é possível observar nos gráficos presentes na figura 25, vemos que as duas condições experimentais em que não há a exposição ao estresse de restrição (condições controles) são as que apresentam maiores explorações dos braços abertos, tanto com relação à %TA (3 = $14,46 \pm 2,9$; 5 = $16,8 \pm 2,19$), quanto com relação à %FA (3 = $28,44 \pm 3,04$; 5 = $27,39 \pm 2,21$).

Dessa forma, a ANOVA não mostrou diferenças entre as condições controles, e nem entre as condições com estresse, sendo as condições controles iguais entre si, assim como as três condições com exposição ao estresse também são iguais entre si. Porém, quando as condições com estresse são comparadas com as condições controle, é possível observar que há diferenças entre elas: as três condições com estresse apresentam redução da exploração dos braços abertos, sem alterar a frequência de entradas nos braços fechados, um parâmetro locomotor indireto.

**Validação do protocolo experimental:
Estresse de restrição seguido pelo LCE**

Figura 25: Validação do protocolo experimental do estresse de restrição seguido pela exposição ao LCE 24 horas depois. Foi demonstrado aumento da aversão aos braços abertos nos animais estressados. Estão representadas as médias $\pm$ EPM da porcentagem de tempo dispendido nos braços abertos (%TA; painel A), da porcentagem de frequência nos braços abertos (%FA; painel B) e das frequências de entradas nos braços fechados (FF; painel C). O asterisco (*) representa diferença com relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.4 Nado forçado

5.4.1 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR de ratos imediatamente antes do pré-teste do NF sobre o comportamento expresso no teste 24 horas depois:

A figura 26 mostra os resultados da manipulação farmacológica intra-NMR que ocorreu imediatamente antes do pré-teste e, dessa forma, 24 horas antes do teste.

A ANOVA indicou diferenças significativas entre os grupos tanto para a latência de imobilidade ($F_{3,36}=13,31$; $p<0,05$), quanto para o tempo de imobilidade ($F_{3,36}=8,61$; $p<0,05$).

Ao analisarmos o tempo de imobilidade, o pós teste de Tukey mostrou que o tratamento com o agonista foi o único a apresentar diferenças dentro desta condição, de forma que o tratamento com LP-44 (salina + LP-44 = $71,3 \pm 10,75$) foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade, se comparado aos demais tratamentos desta condição (salina: $122,7 \pm 10,17$; SB: $147,4 \pm 19,7$; SB+LP: $165,9 \pm 16,62$).

Com relação à latência, o pós teste de Tukey indicou que o tratamento com o agonista (salina + LP-44 = $119,60 \pm 16,04$) apresentou maior latência para o primeiro episódio de imobilidade quando comparado ao tratamento com antagonista (SB-258741 + salina = $29,88 \pm 2,31$) e ao tratamento com ambas as drogas (SB + LP = $42,22 \pm 9,27$). Por outro lado, os tratamentos com o SB e com SB+LP reduziram as latências em comparação ao tratamento controle (salina + salina = $82,38 \pm 8,78$). Vale destacar que o tratamento com LP-44 não difere estatisticamente do salina, porém o “valor p” desta comparação é de 0,0617, se configurando uma tendência à diferença estatística ($0,1>p>0,05$).

A tabela 3 mostra os resultados dos comportamentos secundários analisados no teste do NF. Foram contabilizados as frequências de mergulho e escalada, bem como o tempo dispendido em cada um destes comportamentos. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos nesta condição experimental.

Tabela 3: Comportamentos secundários (média $\pm$ EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente antes do pré-teste.

Tratamento Intra-NMR	Freq. Escalada	Tempo Escalada	Freq. Mergulho	Tempo Mergulho
Salina	$6,84 \pm 1,06$	$117,5 \pm 14,47$	$1,30 \pm 0,47$	$1,30 \pm 0,47$
LP-44	$7,90 \pm 1,27$	$94,7 \pm 17,45$	$0,5 \pm 0,26$	$0,6 \pm 0,33$
SB-258741	$7,5 \pm 1,45$	$63,75 \pm 18,59$	$2,62 \pm 1,65$	$2,62 \pm 1,65$
SB+LP	$6,33 \pm 0,60$	$74,22 \pm 17,95$	$2,55 \pm 1,34$	$2,88 \pm 1,45$

Figura 26: Administração de LP-44 no NMR de ratos imediatamente antes da sessão pré-teste do nado forçado reduz o comportamento tipo depressivo expresso na sessão teste 24 horas depois. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do tempo total de imobilidade (TI; painel A) o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI; painel B). O asterisco (*) representa diferenças em relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.4.2 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR de ratos imediatamente depois do pré-teste do NF sobre o comportamento expresso no teste 24 horas depois:

A figura 27 mostra os resultados da condição experimental em que a manipulação farmacológica intra-NMR ocorreu imediatamente após o pré-teste e 24 horas antes do teste.

Com relação ao tempo de imobilidade a ANOVA indicou uma diferença entre os grupos ($F_{3,41}=5,92$; $p<0,05$), sendo que o pós teste mostrou que o tratamento com LP-44 foi capaz de reduzir o tempo do imobilidade em comparação ao tratamento controle e aos demais tratamentos (salina + LP-44 = $128,5 \pm 4,05$; salina + salina = $161,9 \pm 8,42$; SB-258741 + salina = $165,8 \pm 6,93$). Além disso, o tratamento com o antagonista previamente ao agonista foi capaz de antagonizar tal efeito (SB + LP = $156,3 \pm 7,27$).

Porém, a ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,41}=0,085$; $p>0,05$) para a latência do primeiro episódio de imobilidade.

Além disso, a tabela 4 mostra os resultados dos comportamentos secundários analisados na sessão teste desta condição experimental. Novamente, a ANOVA não indicou nenhuma diferença entre os tratamentos.

Tabela 4: Comportamentos secundários (média $\pm$ EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente depois do pré-teste.

Tratamento Intra-NMR	Freq. Escalada	Tempo Escalada	Freq. Mergulho	Tempo Mergulho
Salina	$11,17 \pm 1,28$	$56,67 \pm 8,93$	$2,50 \pm 0,78$	$3,66 \pm 1,22$
LP-44	$11,55 \pm 1,15$	$67,09 \pm 10,42$	$1,63 \pm 0,72$	$2,72 \pm 1,28$
SB-258741	$11,92 \pm 1,49$	$50,67 \pm 7,78$	$1,91 \pm 0,76$	$4,16 \pm 1,74$
SB+LP	$11,30 \pm 1,18$	$49,90 \pm 8,12$	$2,60 \pm 1,72$	$6,40 \pm 4,54$

Figura 27: Administração de LP-44 no NMR rato des, imediatamente depois da sessão pré-teste do nado forçado reduz o comportamento tipo depressivo expresso na sessão teste 24 horas depois. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do tempo total de imobilidade (TI; painel A) o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI; painel B). O asterisco (*) representa diferença em relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.4.3 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR 24 horas antes do teste do NF sem exposição ao pré-teste (condição controle):

Na figura 28 estão presentes os resultados da condição experimental controle das duas anteriores no protocolo do nado forçado. Nesta condição a manipulação farmacológica intra-NMR ocorreu 24 horas antes do teste e os animais não foram expostos ao pré-teste.

Não foram observadas diferenças estatísticas com relação ao tempo de imobilidade entre os grupos ($F_{3,39}=2,05$; $p>0,05$). Além disso, a latência para o primeiro episódio de imobilidade também não apresentou diferença entre os grupos ($F_{3,39}=0,844$; $p>0,05$).

Nesta condição controle também foram contabilizados os comportamentos secundários, como nas duas condições anteriores e novamente não foram encontradas diferenças. Os resultados dos comportamentos de escalada e mergulho estão representados na tabela abaixo.

Tabela 5: Comportamentos secundários (média $\pm$ EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR 24 horas antes e não passaram pelo pré-teste.

Tratamento Intra-NMR	Freq. Escalada	Tempo Escalada	Freq. Mergulho	Tempo Mergulho
Salina	14,64 $\pm$ 1,74	56 $\pm$ 6,87	5,72 $\pm$ 1,77	7,63 $\pm$ 2,17
LP-44	14,92 $\pm$ 1,96	63,42 $\pm$ 12,26	5,08 $\pm$ 2,23	8,16 $\pm$ 3,97
SB-258741	14,44 $\pm$ 1,94	48,56 $\pm$ 9,59	6,11 $\pm$ 1,55	9,44 $\pm$ 3,71
SB+LP	12,45 $\pm$ 1,47	93,36 $\pm$ 20,97	4,09 $\pm$ 1,56	7,0 $\pm$ 3,15

Controle: injeção → Teste

Figura 28: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no núcleo mediano da rafe de ratos, 24 horas antes da sessão teste do nado forçado sem a exposição prévia ao pré-teste. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do tempo total de imobilidade (TI; painel A) e da latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI; painel B). O asterisco (*) representa diferença em relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.4.4 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR de ratos imediatamente antes do teste do NF em ratos que passaram pelo pré-teste 24 horas antes:

A figura 29 mostra os resultados desta condição experimental, na qual a manipulação farmacológica intra-NMR foi realizada imediatamente antes do teste e, dessa forma, 24 horas após o pré-teste.

Com relação ao TI a ANOVA indicou diferenças entre os grupos ($F_{3,41}=12,7$; $p<0,05$). O pós teste indicou que o tratamento com agonista de 5-HT₇ intra-NMR se mostrou promissor, reduzindo o TI em relação aos demais tratamentos (salina + LP-44 = $80,08 \pm 16,15$; salina + salina = $157,9 \pm 9,10$; SB-258741 + salina = $156,7 \pm 9,35$; SB + LP = $168,51 \pm 9,03$). Os demais tratamentos novamente não foram diferentes entre si.

A ANOVA de uma via seguida pelo pós teste indicaram o mesmo perfil de diferenças observadas entre os grupos ($F_{3,41}=10,21$; $p<0,05$) para a latência do primeiro episódio de imobilidade. O pós teste mostrou que o tratamento com LP-44 foi capaz de aumentar a latência para o primeiro episódio de imobilidade em comparação aos demais tratamentos (salina + LP-44 = $148,6 \pm 18,98$; salina + salina = $79,91 \pm 7,90$; SB-258741 + salina = $59,67 \pm 8,26$; SB + LP = $75,00 \pm 10,92$). Os demais tratamentos não diferem entre si.

A tabela 6 mostra os resultados dos comportamentos secundários analisados no teste do NF. Foram contabilizados as frequências de mergulho e escalada, bem como o tempo dispendido em cada um destes comportamentos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 6: Estão representados as médias $\pm$ EPM dos comportamentos secundários analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente do teste e passaram pelo pré-teste 24 horas antes

Tratamento Intra-NMR	Freq. Escalada	Tempo Escalada	Freq. Mergulho	Tempo Mergulho
Salina	$5,81 \pm 0,79$	$14,45 \pm 2,37$	$3,63 \pm 1,49$	$7,72 \pm 3,82$
LP-44	$7,08 \pm 1,19$	$19,67 \pm 4,05$	$1,25 \pm 0,49$	$2,08 \pm 0,70$
SB-258741	$6,33 \pm 0,89$	$15,58 \pm 3,62$	$1,08 \pm 0,55$	$1,75 \pm 0,89$
SB+LP	$3,70 \pm 0,76$	$12,30 \pm 3,94$	$1,40 \pm 0,52$	$2,30 \pm 0,88$

Figura 29: Administração de LP-44 no NMR de ratos 24 horas após o pré-teste reduz os comportamentos de tipo depressivo na sessão teste imediatamente após o tratamento farmacológico. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do tempo total de imobilidade (TI; painel A) o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI; painel B). O asterisco (*) represente diferença em relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.4.5 Resultados da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do teste do NF em ratos não expostos ao pré-teste (condição controle):

A figura 30 mostra os resultados desta condição controle. Nesta condição a manipulação farmacológica intra-NMR foi realizada imediatamente antes do teste e sem a exposição ao pré-teste 24 horas antes.

Com relação ao tempo de imobilidade (TI) a ANOVA não encontrou diferenças entre os tratamentos ($F_{3,32}=0,98$; $p>0,05$).

A ANOVA de uma via também não mostrou diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,32}=0,329$; $p>0,05$) para a latência do primeiro episódio de imobilidade.

A tabela Y mostra os resultados dos comportamentos desta condição controle. Foram contabilizados as frequências de mergulho e escalada, bem como o tempo dispendido em cada um destes comportamentos. A ANOVA não indicou nenhuma diferença significativa entre os grupos em nenhum parâmetro analisado.

Tabela 7: Comportamentos secundários (média $\pm$ EPM) analisados durante o teste do nado forçado em animais que receberam as injeções intra-NMR imediatamente do teste sem passar pelo pré-teste.

Tratamento Intra-NMR	Freq. Escalada	Tempo Escalada	Freq. Mergulho	Tempo Mergulho
Salina	9,40 $\pm$ 1,27	35,6 $\pm$ 5,61	7,00 $\pm$ 2,20	17,40 $\pm$ 6,65
LP-44	8,77 $\pm$ 1,24	47,22 $\pm$ 7,18	4,66 $\pm$ 1,64	11,44 $\pm$ 4,69
SB-258741	11,63 $\pm$ 2,06	55,63 $\pm$ 8,52	4,37 $\pm$ 1,49	8,62 $\pm$ 3,20
SB+LP	11,44 $\pm$ 0,80	53,67 $\pm$ 2,94	2,55 $\pm$ 1,29	5,33 $\pm$ 3,00

Controle: injeção + Teste

Figura 30: Ausência de efeito da administração de LP-44 e de SB-258741 no núcleo mediano da rafe de ratos imediatamente antes do teste no nado forçado, sem a exposição prévia ao pré-teste 24 horas antes. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do tempo total de imobilidade (TI; painel A) o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (LI; painel B). O asterisco (*) represente diferença em relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

5.4.6 – Validação do protocolo experimental do NF

Novamente, para demonstrar o bom funcionamento do protocolo experimental empregado foi realizada uma ANOVA comparando os tratamentos controles (salina+salina) das condições experimentais do protocolo do NF. Dessa forma, é possível mostrar que apenas o pré-teste com 15 minutos de duração, 24 horas antes do teste (5 minutos) é capaz de aumentar os comportamentos tipo depressivo observados na sessão teste.

A figura 31 mostra os resultados da validação do protocolo experimental do nado forçado. A ANOVA indicou diferença estatística entre os grupos para o tempo de imobilidade ($F_{4,52}=15,99$; $p<0,05$) e, acordo com o teste post hoc, o TI é superior nas três condições em que há a exposição ao pré-teste (1, 2 e 4, respectivamente: $122,7 \pm 10,17$; $161,9 \pm 8,42$; $157,9 \pm 9,10$). Dessa forma, as duas condições controles apresentam menor tempo de imobilidade (3 e 5, respectivamente $83,27 \pm 9,03$; $92,5 \pm 6,31$) e também não diferem entre si.

Novamente, neste protocolo de validação, os números das condições experimentais (1-5) estão de acordo com a representação da figura 6.

Validação do protocolo experimental do nado forçado

Figura 31: Validação do protocolo experimental do nado forçado com o pré-teste 24 horas antes do teste. Foi demonstrado aumento do comportamento tipo depressivo (imobilidade) nos animais que passaram pelo pré-teste. Estão representadas as médias $\pm$ EPM do tempo imóvel durante o teste (TI; painel A). O asterisco (*) represente diferença em relação ao tratamento controle. Os números presentes na legenda indicam o número de animais por tratamento. (ANOVA de uma via seguida de Tukey).

6. Discussão

Tendo em vista a importância de se estudar as vias, as estruturas e os mecanismos neurais relacionados à resposta ao estresse, bem como os envolvidos na modulação de comportamentos do tipo ansioso e depressivo, os modelos animais se mostram essenciais para a compreensão dos processos neurofisiológicos e neuropsicofarmacológicos envolvidos.

O LCE é um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados em todo o mundo. Pellow *et al.* (1985) validaram as medidas clássicas para verificar comportamento do tipo ansioso em ratos no LCE. Na análise comportamental leva-se em conta o número de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos e fechados durante os cinco primeiros minutos de teste no aparato. Como dito anteriormente, a análise do comportamento neste modelo animal se baseia no conflito gerado pela tendência natural dos ratos em explorar novos ambientes evitando situações potencialmente perigosas. Ou seja, este comportamento é atribuído à aversão natural causada pelos braços abertos em ratos, por estes serem locais desprotegidos e os animais estarem mais expostos a um potencial perigo.

De forma geral, é assumido que os fármacos que induzem uma maior exploração dos braços abertos sem afetar a atividade locomotora do animal apresentam um efeito ansiolítico, enquanto que os fármacos que levam a uma maior exploração dos braços fechados, apresentam efeitos ansiogênicos (WEISS *et al.*, 1998).

A literatura ainda é bastante escassa quanto aos efeitos de fármacos que atuam sobre 5-HT₇ quando administrados em estruturas cerebrais específicas. Desta forma, foi necessário realizar uma curva dose-resposta para determinar quais doses dos fármacos utilizados não teriam, por si só, efeito sobre a atividade locomotora (AL) dos animais no LCE.

Os resultados da curva dose-resposta não mostraram diferenças significativas após o tratamento intra-NMR com as diferentes doses de SB-258741 e/ou LP-44 (tabela 1) em ratos imediatamente antes do teste comportamental no LCE (figura 19).

Embora haja poucos estudos sobre a participação do receptor de 5-HT₇ na AL de ratos, há destaque na literatura para a 5-HT na modulação das funções motoras. Isso se dá devido a atuação do sistema serotoninérgico em diversas estruturas envolvidas nesta função, como os núcleos da base, o sistema límbico e o córtex frontal. Desta forma, além da influência serotoninérgica no humor e na cognição, há evidências de sua participação também no comportamento motor (MILLAN *et al.*, 2003). Além disso, como já mencionado também é postulada a relação entre alteração da função motora em estados depressivos de humor. Millan *et al.*, (2003) também demonstraram que o citalopram (um ISRS) é capaz de aumentar a AL de camundongos. Assim, os pesquisadores investigaram as múltiplas influências de receptores serotoninérgicos, incluindo o 5-HT₇, no aumento da AL induzida pelo

citalopram. Diferentemente de outros antagonistas para receptores de 5-HT utilizado no estudo, o uso do antagonista de 5-HT₇ (SB-269970; 10mL/kg; sc.) não alterou a AL induzida pelo citalopram e também não apresentou efeito sobre a locomoção quando administrado isoladamente (AL=266.7±8.8; 10mL/kg; sc) (MILLAN et al., 2003).

Em um estudo realizado por Mnie-Filali et al. (2011) foi observado que a administração de um antagonista de 5-HT₇ (SB-269970, 0,5 mg/Kg, i.p.) não teve efeitos sobre a AL de ratos submetidos ao teste do nado forçado. A administração intra-hipocampal de SB-269970 (3; 10µg/0,5µL), também não foi capaz de modificar a atividade locomotora de ratos expostos ao teste do nado forçado (WESOŁOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ, 2006). Por fim, esse mesmo antagonista também foi testado em ratos *Wistar* no LCE (0,25-2.5mg/kg) e não foram observadas alterações dos parâmetros de AL nestes animais (WESOŁOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ, 2006).

Estes dados vão ao encontro de nossos resultados, os quais mostram que não há alteração da AL em nenhum dos tratamentos intra-NMR realizados na curva dose-resposta (Figura 19). Estes efeitos estão de acordo com a literatura que mostra que os receptores do tipo 5-HT₇ estão ausentes ou presentes em baixas quantidades em estruturas envolvidas no controle da função motora (TO et al., 1995, GUSTAFSON et al., 1996, NEUMAIER et al., 2001).

Dessa maneira, considerando-se que não foram observadas alterações da atividade exploratória no LCE com nenhuma das doses dos fármacos, foram selecionadas as doses 0,1 nmol do SB-258741 e 0,3 nmol do LP-44 para dar continuidade ao estudo.

O estresse de restrição é capaz aumentar os níveis de corticosterona plasmática (ALOISI; CECCARELLI; LUPO, 1998) e este efeito perdura por pelo menos 24 horas em diversas linhagens de ratos (PERHACH; BARRY, 1970). Nesta mesma linha, diversos autores já demonstraram que o estresse de restrição, além de alterar a reatividade do eixo HPA, é capaz de induzir alterações comportamentais em ratos (ALOISI; CECCARELLI; LUPO, 1998, D'AQUILA et al. 2000, KLENEROV et al., 2002, MERCIER et al. 2003, NGAMPAMUAN et al., 2007, JADAVJI; METZ, 2008). Também foi constatada uma ativação massiva de AMPc na adrenal (>2000%) apenas enquanto a corticosterona se manteve aumentada após o estresse (KEIM; SIGG, 1976).

A combinação do estresse de restrição com o LCE, se mostra um ótimo modelo para avaliar os efeitos comportamentais da exposição à estressores incontrolláveis, uma vez que a pré-exposição ao estresse de restrição pode intensificar comportamentos aversivos naturais em ratos (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). Estes efeitos são observados quando o teste comportamental é realizado 24 horas após o procedimento de restrição forçada, tanto no LCE (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1992, PADOVAN; GUIMARÃES, 2000), quanto no campo aberto (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985a).

Os resultados das cinco condições experimentais realizadas com a exposição ao estresse de restrição seguido pelo LCE 24 horas depois, mostram que o estresse por si só foi capaz de aumentar a aversão dos animais aos braços abertos, levando à alterações comportamentais do tipo ansiogênica. Tal afirmação pode ser constatada pela redução da %TA e %FA nas três condições experimentais em que os animais foram expostos à restrição forçada. Estes resultados vão ao encontro dos dados da literatura que indicam aumento do comportamento ansioso 24 horas após o estresse de restrição, tanto no LCE (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1992, PADOVAN; GUIMARÃES, 2000), quanto no campo aberto (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985^a). Dessa forma, foi possível validar o protocolo experimental empregado para o estudo do comportamento tipo ansioso no LCE que pressupõe aumento do comportamento tipo ansioso no aparato após o estresse de restrição.

Além disso, os resultados indicam que a ativação dos receptores 5-HT₇ presentes no NMR é capaz de bloquear as manifestações comportamentais tipo ansiogênicas induzidas pelo estresse de restrição prévio ao LCE nos três momentos em que ocorreram as manipulação farmacológicas, imediatamente antes e depois do estresse de restrição e imediatamente antes do teste no LCE, 24 horas após a restrição.

Ao analisarmos especificamente a condição na qual o tratamento intra-NMR foi realizado imediatamente antes do estresse de restrição, é possível observar que o tratamento prévio à restrição com o agonista de 5-HT₇ (salina + LP-44) foi capaz de impedir o desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas pelo estresse de restrição no teste comportamental do LCE 24 horas depois. Este efeito pode ser constatado pelo aumento tanto da %FA, quanto da %TA dos ratos tratados com LP-44. Além disso, o tratamento prévio ao agonista com o antagonista (SB + LP) foi capaz de bloquear totalmente tal efeito. O tratamento realizado apenas com o antagonista (SB + salina) não mostrou efeito algum sobre o comportamento tipo ansioso dos animais. Não foram observadas alterações na frequência de exploração dos braços fechados em nenhum tratamento, o que reflete uma ausência de efeito das drogas sobre a AL dos animais.

Da mesma forma, os resultados da condição experimental em que o tratamento farmacológico foi realizado imediatamente após o estresse de restrição também mostram que o tratamento com LP-44 impediu as consequências do estresse sobre o comportamento tipo ansioso de ratos no LCE. Estes animais apresentaram maior exploração dos braços abertos, o que pode ser evidenciado pelo aumento da %FA e pelo aumento da %TA em relação ao tratamento controle. O tratamento com o antagonista SB-258741 imediatamente após o estresse de restrição não foi capaz de alterar o comportamento dos animais, ou seja, eles apresentaram comportamento similar ao tratamento salina desta condição nos três parâmetros analisados (FF, %FA e %TA), mostrando, portanto, que o bloqueio destes receptores

no NMR não impacta o comportamento destes animais. Entretanto, o duplo tratamento farmacológico (SB + LP) impediu apenas parcialmente os efeitos comportamentais do estresse de restrição. O tratamento prévio ao LP-44 com o SB-258741 foi capaz de bloquear o efeito do agonista apenas sobre a %TA, porém com relação à %FA, se mostrou semelhante ao observado no tratamento apenas com o agonista (salina + LP-44). Dessa forma, podemos afirmar que imediatamente após o estresse de restrição o bloqueio prévio dos receptores 5-HT₇ do NMR não foi capaz de bloquear parte dos efeitos induzidos pelo agonista de 5-HT₇ nesta estrutura. Nenhum dos tratamentos levaram a alterações na exploração dos braços fechados, indicando ausência de efeito sobre a AL nesta condição experimental.

Na primeira condição controle os animais receberam injeções intra-NMR e 24 horas depois foram testados no LCE sem que tenham passado pelo protocolo de estresse de restrição. Ao observarmos os dados do tratamento controle deste condição (salina + salina), vemos que os animais exploraram mais os braços abertos se comparados as duas condições com o estresse, como evidenciado nos gráficos presentes na figura 25. Assim, podemos afirmar que a linha de base desta condição controle apresentou um comportamento exploratório no LCE esperado de ratos não estressados (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). Além disso, nenhum dos tratamentos alterou o comportamento dos animais em nenhum dos três parâmetros avaliados (%TA, %FA, FF), sendo possível observar que manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR 24 horas antes do teste no LCE não apresentou efeito algum sobre o comportamento exploratório do animal no aparato.

Na condição experimental em que os animais passaram pelo protocolo de estresse de restrição e 24 horas depois receberam tratamento intra-NMR imediatamente antes do teste no LCE foi observado, novamente, que o estresse mostrou efeito por si só, pois aumentou a aversão natural dos ratos pelos braços abertos, o que pode ser constatado pela redução da %FA e %TA. Nesta condição, o tratamento com LP-44 foi capaz de bloquear as manifestações comportamentais do estresse de restrição, aumentando ambos os parâmetros avaliados nos braços abertos (%FA e %TA). O tratamento prévio ao LP-44 com SB-258741 (SB + LP) foi capaz de antagonizar a resposta comportamental induzida pelo agonista. O tratamento com SB não apresentou efeito sobre o comportamento dos animais. A FF não foi alterada por nenhum dos quatro tratamentos realizados nesta condição, indicando, novamente, ausência de efeito sobre a AL dos animais.

Por fim, na segunda condição controle do LCE, os animais apenas receberam as injeções intra-NMR imediatamente antes do teste no LCE, não sendo expostos ao estresse de restrição. A linha de base segue os padrões descritos na literatura (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000), de forma que os animais não estressados, novamente, apresentaram uma maior exploração dos braços abertos, se comparado aos estressados. Nenhum dos parâmetros analisados (FF, %FA e %TA) foram alterados por nenhum

tratamento. Confirmando, mais uma vez, a especificidade dos tratamento frente a eventos aversíveis prévios ao teste.

Com relação ao teste do nado forçado, ele foi proposto para solucionar o problema de falta de modelos animais seletivamente sensíveis aos antidepressivos clinicamente usados até então. O modelo se baseia na premissa de que quando um roedor é forçado a nadar em um local onde não há escapatória, ele irá apresentar um período inicial de atividades intensas e vigorosas e então cessará os movimentos, realizando apenas os necessários para manter a cabeça acima do nível da água. Os pesquisadores caracterizaram o comportamento de imobilidade como indicando um estado de “desespero comportamental” no qual o animal aprende ser impossível escapar. Uma pré-exposição ao teste, na qual o animal é forçado a nadar por 15 minutos induz hipotermia e hipoatividade durante 30 minutos e caso ele seja reexposto ao nado 24 horas depois por 5 minutos ele irá dispende grande parte do tempo imóvel. Dessa forma, o modelo do nado forçado se baseia no fato de que medicamentos terapêuticos utilizados na clínica para o tratamento da depressão reduz o comportamento de imobilidade dos roedores durante o teste (PORSOLT; PICHON; JALFRE, 1977).

Entretanto, autores já destacaram que apenas o comportamento de imobilidade pode falhar para detectar atividades antidepressivas neste modelo, de forma que comportamentos ativos realizados pelo animal durante o teste também podem ser alterados por antidepressivos (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Dentre os comportamentos ativos, destacam-se o nado a escalada e o mergulho. Foi observado que o comportamento de nado é aumentado seletivamente por antidepressivos que agem sobre o sistema serotoninérgico, enquanto que o comportamento de escalada é aumentada apenas por fármacos que elevam a disponibilidade de norepinefrina. Entretanto, falsos positivos podem ser observados com uso de drogas que aumentam a AL, como a anfetamina, que podem aumentar o comportamento de escalada sem alterar o de imobilidade (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Além destes comportamentos, a latência para o primeiro episódio de imobilidade também ganhou destaque como medida de avaliação do comportamento tipo depressivo no teste do nado forçado (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2009). Por fim, Vieira et al., (2008) sugerem que a frequência de escalada possa ser uma medida indireta para se mensurar alterações no padrão locomotor.

Primeiramente, vale destacar o bom funcionamento do modelo empregado neste estudo. Se analisarmos os resultados da validação do protocolo experimental (figura 31), é possível notar que a sessão pré-teste foi capaz de induzir aumento do comportamento tipo depressivo nos animais testados 24 horas depois, o que pode ser verificado pelo aumento do TI nas três condições em que há exposição ao pré-teste. Estes resultados vão ao encontro do que os autores propuseram inicialmente para avaliar

o comportamento depressivo neste modelo (PORSOLT; PICHON; JALFRE, 1977), o que indica que neste estudo o modelo empregado foi validado comportamentalmente.

De maneira geral, constatamos neste estudo que o tratamento com o LP-44, agonista de 5-HT₇, intra-NMR foi capaz de impedir as consequências comportamentais de tipo depressivas da pré-exposição ao nado forçado.

Especificamente na condição com o tratamento realizado imediatamente antes da sessão pré-teste, o tratamento com LP-44 aumentou a latência para o primeiro episódio de imobilidade em relação ao tratamento com o antagonista SB-258741. O tratamento prévio ao LP-44 com SB-258741 foi capaz de bloquear o efeito agonista. Entretanto, quando o tratamento com LP-44 ($119,6 \pm 16,04$) é comparado com o tratamento salina ($82,38 \pm 8,78$) não observa-se diferença estatística ($p=0,061$), porém podemos nos questionar se estes dados não possam representar uma diferença biológica, de fato. Ainda nesta condição, o comportamento de imobilidade foi aumentado pelo tratamento com LP-44. Dessa forma, podemos afirmar que os receptores 5-HT₇ do NMR se ativados previamente ao pré-teste do nado forçado impedem o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo 24 horas depois no teste.

Na condição experimental com manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR logo após o pré-teste o tempo de imobilidade foi menor nos animais que receberam a injeção intra-NMR do agonista de 5-HT₇ se comparado aos demais tratamentos. Assim, a ativação destes receptores imediatamente após a sessão pré-teste do nado forçado também é capaz de impedir a manifestação do comportamento tipo depressivo 24 horas depois durante a sessão teste. Novamente, o tratamento prévio ao agonista com antagonista foi capaz de bloquear o efeito do LP-44.

Na condição controle em que os animais recebem o tratamento intra-NMR 24 horas antes da sessão teste do nado forçado sem serem expostos ao pré-teste nenhum dos tratamentos surtiu efeito sobre o comportamento tipo depressivo dos animais. Dessa forma, a ativação dos receptores 5-HT₇ do NMR 24 horas antes do teste do nado forçado não gera adaptação ao teste, fato que pode ser confirmado pelos parâmetros latência e tempo de imobilidade que permaneceram inalterados após os tratamentos intra-NMR.

Os animais que passaram pelo pré-teste e 24 horas depois foram submetidos ao teste, tendo recebido as injeções intra-NMR imediatamente antes do teste, apresentaram aumento do comportamento tipo depressivo, uma vez os animais salina passaram mais tempo imóvel, se comparados a sua condição controle. Entretanto, esta resposta comportamental foi impedida pelo tratamento farmacológico intra-NMR com agonista de 5-HT₇. Os animais que receberam injeção de salina seguida por LP-44 apresentaram redução do tempo de latência para o primeiro episódio de

imobilidade, juntamente com redução do TI dispendido no teste. Desta forma, nossos resultados evidenciam que a ativação dos receptores 5-HT₇ do NMR imediatamente antes do teste é capaz de bloquear a manifestação comportamental tipo depressiva que é induzida pela sessão pré-teste do nado forçado.

Por fim, na condição controle com injeção intra-NMR imediatamente antes do teste, os animais não foram expostos a sessão pré-teste. Nenhum dos tratamentos farmacológicos modificou a resposta comportamental dos animais, sendo possível afirmar que a redução do comportamento tipo depressivo só é observada neste teste quando o animal passa pelos 15 minutos de pré-teste 24 horas antes.

Nossos resultados mostram pela primeira vez que a ativação dos receptores 5-HT₇ presentes no NMR apresenta efeito tipo ansiolítico e antidepressivo, no teste do LCE e no nado forçado, respectivamente. Ou seja, em ambos os modelos, o agonista de 5-HT₇ LP-44 injetado diretamente no NMR foi capaz de impedir as manifestações comportamentais de aversão aos braços abertos do LCE em ratos previamente estressados, sem modificar o padrão comportamental dos animais que não foram expostos ao estresse. O mesmo efeito foi observado em relação ao comportamento tipo depressivo no nado forçado, de forma que em todas as condições com exposição ao pré-teste houve redução do TI nos animais que receberam injeção intra-NMR de LP-44.

Este trabalho, portanto, traz pela primeira vez evidências claras e diretas da participação dos receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT₇ presentes no NMR na modulação dos comportamentos de tipo ansioso e depressivo.

Alguns trabalhos já foram realizados com a administração de agonistas e antagonistas de 5-HT₇R em diferentes modelos animais. Redução do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda foi observada após tratamento com antagonistas de 5-HT₇ (ABBAS et al., 2009; SARKISYAN; ROBERTES; HEDLUND, 2010). Mnie-Filali et al. (2011) realizaram um estudo com administração de um antagonista de 5-HT₇ (SB-269970, 0,5 mg/Kg, i.p.) e observaram que o tratamento reduziu o tempo de imobilidade no teste do NF, sugerindo um perfil antidepressivo gerado pelo bloqueio sistêmico de 5-HT₇. Mais além, já foi demonstrado que o bloqueio dos receptores 5-HT₇ levou a um aumento do efeito dos antidepressivos usados (WESOŁOWSKA et al., 2006a, WESOŁOWSKA et al., 2007). Por fim, esse mesmo antagonista também foi testado em ratos *wistar* no LCE (5 mg/kg) e foi observado um perfil de comportamento ansiogênico (WESOŁOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ, 2006b). Além disso, Bonaventure et al. (2011), observaram que durante o tempo de consolidação da memória, a expressão de RNAm de 5-HT₇ mostrou-se mais elevada. Estes resultados sugerem que o bloqueio dos receptores

5-HT₇ pode ter atividade antidepressiva também em humanos, uma vez que poderiam bloquear a formação e/ou evocação de novas memórias relacionadas aos eventos aversivos.

Por outro lado, Eriksson et al. (2012) realizaram um estudo com administração intraperitoneal de dois agonistas de 5-HT₇, o LP-44 (1, 3, 5 e 10 mg/kg, i.p.) e o AS19 (2, 5 e 10 mg/kg, i.p.). Neste estudo eles observaram que durante a esquivas passiva, ambos os agonistas utilizados apresentaram efeito ansiogênico em ratos, mostrando que a ativação deste receptor pode ter relação com situações de estresse em que há um aumento da ansiedade. Outros trabalhos mostraram que um tratamento realizado com agonista de 5-HT₇ facilitou a formação de novas memórias em ratos (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008; BONAVENTURE et al., 2011).

Embora esses dados pareçam contraditórios aos dados da literatura, o papel desempenhado por este receptor está intimamente envolvido com o papel da via NMR-hipocampo nas manifestações comportamentais avaliadas, de forma que uma possível explicação envolve a via de administração utilizada. A maioria dos trabalhos na literatura que investigou o papel dos receptores 5-HT₇ utilizou a via intraperitoneal (i.p.) para administração dos fármacos, enquanto que em nosso estudo, a administração foi realizada diretamente no NMR. Nesse sentido, a administração periférica (i.p.) faz com que o fármaco seja amplamente distribuído por todo o organismo do animal, exercendo sua ação por diferentes estruturas cerebrais onde estejam localizados os 5-HT₇. Por outro lado, ao administrar os fármacos diretamente no NMR, os efeitos resultantes referem-se à participação direta desta estrutura nas respostas comportamentais analisadas.

Deakin e Graeff (1991) sugeriram que os neurônios serotoninérgicos do NMR que se projetam ao hipocampo dorsal, uma estrutura rica em receptores 5-HT_{1A}, seriam os responsáveis pela desconexão de aprendizados e experiências prévias, caso estas levem a uma resposta comportamental do tipo aversiva. A neurotransmissão serotoninérgica, mediada por receptores 5-HT_{1A} hipocampais, pode interferir nas respostas comportamentais à eventos aversivos, aumentando a resiliência ou a tolerância ao estresse (DEAKIN; GRAEFF, 1991, GRAEFF et al., 1996).

Além do NMR, Gray e McNaughton (1983) propuseram que o sistema septo-hipocampal teria um papel central no sistema de inibição comportamental. Esse sistema seria ativado em resposta a sinais de novidade, punição e não-recompensa, levando à inibição de determinados comportamentos e ao aumento da atenção e da excitação cerebral. O hipocampo recebe projeções córtico-hipocampais e na ausência destas projeções, o estímulo se destaca é o que chega ao hipocampo por meio do NMR, levando a uma resposta comportamental do tipo aversiva. Desta forma, o hipocampo estaria envolvido em situações de conflito comportamental, mas não com qualquer situação de novidade ou habituação e sim com aquelas em que o animal se encontra frente a uma situação nova, porém aversiva, onde há

um intenso conflito entre a exploração e/ou aproximação e a evitação. Assim, a hiperfunção hipocampal levaria a um comportamento e a soluções de conflito do tipo aversiva (Gray; McNaughton, 2000).

Mais além, o ritmo teta é um tipo de onda cerebral que está presente seletivamente durante dois estados comportamentais, sendo estes o sono REM e durante comportamentos exploratórios e de avaliação de risco (VERTES; KOCSIS, 1997). Além disso, já foi proposto que o ritmo teta exerça um importante papel no processo de LTP (*long term potentiation*) e na facilitação de transferência de informações ao hipocampo e que a 5-HT possa suprimir estes processos. A 5-HT foi capaz de bloquear a indução do ritmo teta por meio da ativação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo e a consequente hiperpolarização dos neurônios hipocampais (VERTES; KOCSIS, 1997).

A literatura também mostra que a remoção de influências do tronco encefálico no sistema septo-hipocampal foi capaz de reduzir ou abolir completamente o ritmo teta. Porém, o NMR é a única estrutura do troco encefálico que se estimulada leva a uma dessincronização do ritmo teta hipocampal (VERTES; KOCSIS, 1997), enquanto que se lesionado resulta em indução contínua do ritmo teta (MARU; TAKAHASHI; IWAHARA, 1979). Há evidências de que a capacidade de interrupção do ritmo teta, por meio da ativação da via NMR-hipocampo, é mediada por serotonina, pois o ritmo teta contínuo gerado por lesões no NMR é revertido com a administração de triptofano (YAMAMOTO et al., 1979). Por outro lado, a administração de agonistas 5-HT_{1A} diretamente no NMR foi capaz de gerar ritmo teta hipocampal contínuo, provavelmente pela inibição desta estrutura (KINNEY et al., 1993, VERTES; KOCSIS, 1997). Nesta mesma linha, estudos *in vitro* mostraram que fatias da formação hipocampal perfundidas com antagonista de receptores 5-HT_{1A}, foram capazes de desenvolver ritmo teta (KAZMIERSKA; KONOPACKI, 2015).

Além da participação do sistema serotoninérgico mediada pelos receptores 5-HT₇, é possível que o sistema glutamatérgico também esteja envolvido na mediação das consequências comportamentais do estresse, interagindo com o sistema serotoninérgico (TAO; AUERBACH, 2003). Nesta linha, Izquierdo e Medina (1997) mostraram o envolvimento de diversas cascatas intra-hipocampais relacionadas com a formação de memória. Dados eletrofisiológicos, mostram que o aumento da excitabilidade hipocampal mediada por receptores glutamatérgicos está relacionada com a facilitação da formação de memórias. De forma inversa, o bloqueio destes receptores se relaciona com o bloqueio de formação de memórias. Os autores observaram também que as membranas sinápticas extraídas da região CA1 do hipocampo (principal local de chegada no hipocampo dos neurônios serotoninérgicos do NMR) apresentaram um aumento das subunidades NMDA e GluR1 de receptores de glutamato. Tal aumento perdurou na CA1 e na CA2 por até três horas, enquanto que na

CA3 e no giro denteado, por até uma semana. O aumento destas subunidades pode ser correlacionado com uma maior fosforilação de proteínas (AMPC, GMPc, PKA, PKC, CaMKII, CREB) que desencadeiam cascatas intracelulares. Tais cascatas, por sua vez estão relacionadas com processos de plasticidade neural tanto no hipocampo, quanto em suas áreas de projeções, refletindo o papel do hipocampo em três diferentes circuitos (aquisição, consolidação e evocação de memórias aversivas) (Izquierdo; Medina, 1997).

Ainda com relação ao sistema glutamatérgico, há evidências de que a ativação dos neurônios serotoninérgicos do NMR de projeção ao hipocampo dorsal é mediada por receptores de glutamate do tipo NMDA (TAO; AUERBACH, 1996). Já foi demonstrado também que o bloqueio dos receptores NMDA presentes no hipocampo dorsal é capaz de impedir as manifestações comportamentais decorrentes do estresse de restrição no LCE (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000) e da pré-exposição ao nado forçado (PADOVAN; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000), reforçando o papel destes receptores nos comportamentos avaliados neste estudo.

Sabemos também que a ativação dos receptores de serotonina de tipo 5-HT_{1A} presentes no hipocampo (PADOVAN; GUIMARÃES, 1993; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003) e no NMR (ALMEIDA et al., 2013) é capaz de atenuar os efeitos comportamentais da exposição a estressores, tanto em modelos de ansiedade, quanto em modelos de depressão. De forma contrária, lesões no NMR resultam em comportamento ansiogênico devido à falha na liberação de serotonina no hipocampo, fato que faz com que os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} dessa região não se ativem e, portanto não ocorra a hiperpolarização dessa região (NETTO et al., 2002).

De acordo com Calizo et al. (2011), a rafe como um todo apresenta neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos, de forma que os neurônios não-serotoninérgicos estão presentes em quantidades iguais ou maiores aos serotoninérgicos no NMR e no NDR. Os neurônios glutamatérgicos estão intermixados e co-localizados com neurônios serotoninérgicos por todas as áreas da rafe, tais co-localizações também estão presentes em regiões terminais, como o córtex e o hipocampo (CALIZO et al., 2011). No entanto, no NMR e no NDR, os neurônios glutamatérgicos e serotoninérgicos estão presentes em quantidades muito elevadas, quando comparados aos demais sítios da rafe (CALIZO et al., 2011). Neste sentido, Kelly et al. (2011), mostraram por meio de imunohistoquímica que o teste do nado forçado levou a ativação de neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos em núcleos da rafe (KELLY et al., 2011).

Dados da literatura sugerem que os receptores 5-HT₇ do NMR sejam heterorreceptores, ou seja, estes receptores estão localizados em neurônios não-serotoninérgicos dessa estrutura, especificamente em neurônios glutamatérgicos, podendo estar presentes pré e pós sinapticamente

(HARSING et al., 2004). Outras duas evidências importantes são que o NMR recebe projeções glutamatérgicas do NDR e do córtex pré-frontal e que a estimulação de receptores de glutamato de tipo NMDA presentes no NMR leva a um aumento nas concentrações extracelulares de 5-HT tanto no próprio NMR quanto no hipocampo (TAO; AUERBACH, 2003). Em conjunto, esses dados sugerem que o NMR apresenta uma circuitaria envolvendo os sistemas serotoninérgico e glutamatérgico, onde ambos participam da modulação de comportamentos de tipo ansioso e depressivo.

Dessa forma, os efeitos de atenuação das consequências comportamentais dos estressores observados nos tratamentos com LP-44 pode ser explicado considerando-se que a via NMR-hipocampo exerce ação inibitória sobre o hipocampo, via receptores 5-HT_{1A} (DEAKIN; GRAEFF, 1991, GRAY; McNAUGHTON, 2000) e o receptor 5-HT₇ está acoplado a uma proteína Gs (BARD, et al., 1993, RUAT et al., 1993, THOMAS et al., 1999). Como os receptores 5-HT₇ presentes no NMR estão localizados em neurônios glutamatérgicos (HARSING et al., 2004), uma possível explicação é que eles estejam presentes tanto nos terminais axonais dos neurônios glutamatérgicos da via córtico-NMR, quanto em interneurônios e neurônios colaterais glutamatérgicos do NMR.

Nesse sentido, é possível que a estimulação dos heterorreceptores 5-HT₇ presentes nos interneurônios glutamatérgicos do NMR aumente a liberação de glutamato nesta estrutura. Este aumento da liberação de glutamato ativa os receptores glutamatérgicos de tipo NMDA presentes nos neurônios serotoninérgicos da via NMR-hipocampo, ativando esta via. Por sua vez, a 5-HT liberada pela via NMR-hipocampo atuará sobre os receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT_{1A}, que possuem ação inibitória, dos neurônios de projeção ao hipocampo dorsal, levando à inibição das consequências comportamentais relacionadas ao estresse.

Os resultados deste trabalho vão ao encontro do que foi proposto por Deakin e Graeff (1991), assim, sugerimos que a ativação dos receptores 5-HT₇ do NMR é capaz de ativar os neurônios serotoninérgicos desta estrutura que se projetam para o hipocampo, via liberação de glutamato. Portanto, a ativação dos receptores 5-HT₇ do NMR leva a uma resposta comportamental semelhante ao que ocorre quando há interrupção do ritmo teta hipocampal, sendo, portanto, mais uma evidência de como os receptores 5-HT₇ do NMR podem facilitar a adaptação comportamental a eventos aversivos. Podemos supor, portanto, que os receptores de tipo 5-HT₇ presentes no NMR também exerçam um papel importante na mediação da interrupção do ritmo teta hipocampal por meio da ativação da via NMR-hipocampo, como já proposto anteriormente e, consequentemente, dos receptores hipocâmpais de tipo 5-HT_{1A}, inibindo assim respostas comportamentais aversivas (DEAKIN; GRAEFF, 1991, KINNEY et al., 1993, VERTES; KOCSIS, 1997), como o comportamento tipo ansioso e depressivo nos testes utilizados.

7. Conclusão

Os resultados deste estudo mostram de forma clara que a ativação dos receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT₇ do NMR imediatamente antes e depois do estresse, assim como imediatamente antes do teste no LCE, é capaz de impedir as manifestações comportamentais do tipo ansiosa resultantes do estressor.

Além disso, a ativação dos receptores 5-HT₇ do NMR também pode bloquear as manifestações comportamentais tipo depressiva no modelo do NF, quando ativados imediatamente antes e depois da sessão pré-teste e imediatamente antes da sessão teste.

Podemos concluir também que o bloqueio dos receptores 5-HT₇ do NMR não surte efeito algum nem sobre o comportamento ansioso e nem sobre o depressivo induzido pelos estressores. Porém vale destacar que os efeitos observados pela ação do LP-44 são bloqueados pela administração prévia de SB-258741, o que nos permite concluir que o efeito observado com a administração de LP-44 é, de fato, devido a sua ação sobre o 5-HT₇.

Foi mostrado também que a manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR 24 horas ou imediatamente antes dos testes comportamentais não apresentou efeito algum sobre o comportamento dos animais que não foram expostos aos estressores. Isso nos permite concluir que na ausência de estressores prévios, a ativação destes receptores não tem relação com o comportamento dos animais nem no LCE nem no NF.

Além disso, mostramos por meio de uma curva dose-resposta, que a manipulação dos receptores 5-HT₇ do NMR não é capaz de afetar a AL dos animais no LCE quando o teste é realizado imediatamente após a administração das drogas.

Neste trabalho, também foi possível mostrar que o estresse de restrição 24 horas antes do labirinto é capaz de intensificar a aversão natural dos ratos aos braços abertos. Constatamos também que a sessão pré-teste do nado forçado é capaz de aumentar o comportamento tipo depressivo 24 horas depois na sessão teste.

Dessa forma, mostramos pela primeira vez, por meio de dois estudos comportamentais, que a ativação direta dos receptores 5-HT₇ presentes no NMR é de extrema importância para a adaptação a eventos aversivos, quando estes resultam em comportamentos tipo ansioso e depressivo.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. I.; HEDLUND, P. B.; HUANG, X.-P. et al. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 119–128, 2009.
- ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Behavioural responses to single and repeated restraint in male and female rats. **Behavioural processes**. V. 28, p. 97-110. 1992.
- ALMEIDA, P.V.G.; TROVO, M.C.; TOKUMOTO, A.M.; PEREIRA, A.C.; PADOVAN, C.M. Role of 5-HT_{1A} Receptors in the Median Raphe Nucleus on the behavioural consequences of Forced Swim Stress. **Journal of Psychopharmacology**. 2013.
- ALOISI, A. M.; CECCARELLI, I.; LUPO, C. Behavioral and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. **Brain Research Bulletin**. Vol. 47, pp. 57–62. 1998.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5**: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014
- ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, 1107-1115, 2013.
- ANDREWS, G.; HOBBS, M. J.; BORKOVEC, T. D.; BEESDO, K.; CRASKE, M. G.; HEIMBERG, R. G.; RAPEE, R. M.; RUSCIO, A. M.; STANLEY, M. A. Generalized worry, disorder: a review of DSM-IV generalized anxiety disorder and options for DMS V. **Depression and Anxiety**, v. 27, p. 134-47, 2010.
- BARD, J. A.; ZGOMBICK, J.; ADHAM, N.; VAYSSE, P.; BRANCHEK, T. A.; WEINSHANK, R. L. Cloning of a Novel Human Serotonin Receptor (5-HT₇) Positively Linked to Adenylate Cyclase. **The journal of biological chemistry**. V. 268, n. 31. 1993.
- BAXTER, A. J.; SCOTT, K. M.; VOS, T.; WHITEFORD, H. A. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**, v. 43, p. 897-910, 2013.

BHALLA, P.; SAXENA, P. R.; SHARMA, H. S. Molecular cloning and tissue distribution of mRNA encoding porcine 5-HT₇ receptor and its comparison with the structure of other species. **Molecular and Cellular Biochemistry**. V. 238, p. 81-88. 2002.

BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. **Psychology & Behavior**, v. 73, p. 261-71, 2001.

BONAVENTURE, P.; ALUISIO, L.; SHOBLOCK, J. et al. Pharmacological blockade of serotonin 5-HT₇ receptor reverses working memory deficits in rats by normalizing cortical glutamate neurotransmission. **Plos One**, v. 6, n. 6, p. e20210, 2011.

BRANDÃO, M. L. **As bases biológicas do comportamento**. Introdução à neurociência. 2004.

CALIZO, L. H.; AKANWA, A.; MA, X.; PAN, Y.; LEMOS, J. C.; CRAIGE, C. HEEMSTRA, L. A., BECK, S. G. Raphe serotonin neurons are not homogeneous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**.v. 61, p. 524-543. 2011.

CASPI, A.; SUGDEN, K.; MOFFITT, T. E.; TAYLOR, A.; CRAIG, I. W.; HARRINGTON, H.; McCLAY, J.; MILL, J.; MARTIN, J.; BRAITHWAITE, A.; POULTON, R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**. v. 301, p. 386. 2013.

CHAOULOFF, F. Regulation of 5-HT receptors by corticosteroids: where do we stand? **Fundam Clin Pharmacol**. V.9, P. 219-33. 1995.

CHEETMAN, S. C.; CROMPTON, M. R.; KATONA, C. L. E.; HORTON, R. W. Brain 5-HT₁ bindings sites in depressed suicides. **Psychopharmacology**, v. 102, p. 544-48, 1990.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The Concepts of Stress and Stress System Disorders Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 267, p. 1244-1252, 1992.

CIFARIELLO, A.; POMPILI, A.; GASBARRI, A. 5-HT(7) receptors in the modulation of cognitive processes. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 171–179, 2008.

D'AQUILA, P. S.; PEANA, A. T.; CARBONI, V.; SERRA, G. Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. **European Journal of Pharmacology**. V. 399, p. 43–47. 2000.

DEAKIN, J. F. W. The role of serotonin in depression and anxiety. **European Psychiatry**, v. 13, p. 57-63, 1998.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-15, 1991.

DEL PORTO, J. A. Conceito e Diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, 1999.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, p. 66-72, 1995.

ERIKSSON, T. M.; HOLST, S.; STAN, T. L.; HAGER, T.; SJOGREN, B.; OGREN, S. O.; SVENNINGSSON, P.; STIEDL, O. 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. **Neuropharmacology**, v.63, p.1150-1160, 2012.

FORSTER, E. A.; CLIFFE, I. A.; BILL, D. J.; DOVER, G. M.; JONES, D.; REILLY, Y.; FLETCHER, A. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. **Eur J Pharmacol.**, 281 (1): 81-88. 1995.

GARCÍA-IGLESIAS, B. B.; MENDOZA-GARRIDO, M. E.; GUTIÉRREZ-OSPINA, G.; RANGEL-BARAJAS, C.; NOYOLA-DÍAZ, M.; TERRÓN, J. A. Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: Involvement of 5-HT₇ receptors. **Neuropharmacology**. V.71, p. 216-27. 2013.

GELERNTER, J.; RAO, P. A.; PAULS, D. L.; HAMBLIN, M. W.; SIBLEY, D. R.; KIDD, K. K. Assignment of the 5HT₇ Receptor Gene (5-HTR7) to Chromosome 10q and Exclusion of Genetic Linkage with Tourette Syndrome. **Genomics**. V. 26, p. 207-9. 1995.

GORMAN, J. M. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. **Depression and Anxiety**, v. 4, p. 160-68, 1997.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G. C. S.; DEAKIN, J. F. W. Role of 5-HT in Stress, Anxiety and Depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. V. 23, P. 237-246. 1998.

GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. Comparison between the behavioural effects of serptal and hippocampal lesions: a review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. V. 7. P.119-188. 1983.

GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety. **Oxford University Press**. New York. Second edition. 2000.

GUSTAFSON, E. L.; DURKIN, M. M.; BARD, J. A.; ZGOMBICK, J.; BRANCHEK, T. A. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. **British Journal of Pharmacology**. V. 117, p. 657-66. 1996.

HEDLUND, P. B. The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview. **Psychopharmacology**, v. 206, n. 3, p. 345–54, 2009.

HEDLUND, P. B.; SUTCLIFFE, J. G. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. **Trends in pharmacological sciences**, v. 25, n. 9, p. 481–6, 2004.

HEIDMANN, D. E. A.; METCALF, M. A.; KOHEN, R.; HAMBLIN, M. W. Four 5-Hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) Receptor Isoforms in Human and Rat Produced by Alternative Splicing: Species Differences Due to Altered Intron-Exon Organization. **Journal of Neurochemistry**. V. 68, 1372-81. 1997.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neuroscience**, v. 20, p. 78-84, 1997.

HRDINA, P. D.; DEMETER, E.; VU, T. B.; SÓTÓNYI, P.; PALKOVITS, M. 5-HT uptake sites and 5-HT₂ receptors in brain of antidepressant-free suicide victims/depressives: increase in 5-HT₂ sites in cortex and amygdala. **Brain Research**, v. 614, p. 37-44, 1993.

HUETHER, G.; DOERING, S.; RUGER, U.; RUTHER, E.; SCHUSSLER, G. **Psychiatry Research**, v. 87, p. 83-95, 1999.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of learning and memory**. V. 68, p. 285–316. 1997.

JADAVJI, N. M.; METZ, G. A. Sex differences in skilled movement in response to restraint stress and recovery from stress. **Behavioural Brain Research**. V. 195, p. 251-259. 2008.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. Supl II, p. 46–51, 2003.

KAZMIERSKA, P.; KONOPACKI, J. Development of the theta rhythm in hippocampal formation slices perfused with 5-HT_{1A} antagonist, (S) WAY100135. **Brain research**. 2015.

KEIM, K. L.; SIGG, E. B. Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. Vol. 4, p. 289-297. 1976.

KELLY, K. J.; DONNER, N. C.; HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Swim stress activates serotonergic and nonserotonergic neurons in specific subdivisions of the rat dorsal raphe nucleus in a temperature-dependent manner. **Neuroscience**. V. 197, P. 251–268. 2011.

KEMENY, M. E. The Psychobiology of Stress. **American Psychological Society**, v.12, 124-129, 2003.

KENDLER, K. S.; KESSLER, R. C.; WALTERS, E. E. et al. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **The American journal of psychiatry**, v. 152, n. 6, p. 833–42, 1995.

KENNETT, G. A.; DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Central serotonergic responses and behavioral adaptation to repeated immobilization: The effect of corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. **Eur. J. Pharmacol.** 119: 143-152. 1985a.

KINNEY, G. G.; VERTES, R. P.; KOCSIS, B.; FORTIN, W. J. Changes in hippocampal EEG resulting from injections of 5-HT_{1A} agonists into the median raphe nucleus. **Soc. Neurosci.** V.19. 1993.

KLENEROVÁ, V.; KAMINSKÝ, O.; SIDA, P.; KREJCI, I.; HLINÁK, Z.; HYNIE, S. **Behavioural Brain Research.** V. 136, p. 21-29. 2002

KROBERT, K. A.; BACH, T.; SYVERSVEEN, T.; KVINGEDAL, A. M.; LEVY, F. O. The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.** V. 363, p. 620-32. 2001.

KROENKE, K.; SPITZER, R. L.; WILLIAMS, J. B. W.; MONAHAN, P. O.; LOWE, B. Anxiety disorders in primary care: prevalence, impairment, comorbidity, and detection. **Annals of Internal Medicine,** v. 147, p. 317-325, 2007.

LAPLANTE, P.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT₇ receptor. **Developmental Brain Research.** V. 139, p. 199-203. 2002.

LOVENBERG, T. W.; BARON, B. M.; LECEA, L.; MILLER, J. D. PROSSER, R. A.; REA, M. A.; FOYE P. E.; RACKE, M.; SLONE, A. L.; SIEGEL B. W.; DANIELSON, P. E.; SUTCLIFFE, J. G.; ERLANDER M. G. A Novel Adenylyl Cyclase-Activating Serotonin Receptor (5-HT₇) Implicated in the Regulation of Mammalian Circadian Rhythms. **Neuron.** V. 11, p. 449-458. 1993.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. D. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul,** v. 25, n. suplemento 1, p. 65–74, 2003.

MARU, E.; TAKAHASHI, L. K.; IWAHARA, S. Effects of median raphe nucleus lesion on hippocampal EEG in the freely moving rat. **Brain Research,** v. 163, p. 223-234. 1979.

McEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**. V. 886, p. 172-89, 2000.

MENGUY, R. Effects of restraint stress on gastric secretion in the rat. **American journal of digestive diseases**. V. 5. 1960.

MERCIER, S.; CANINI, F.; BUGUET, A.; CESPUGLIO, R.; MARTIN, S.; BOURDON, L. Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences. **Behavioural Brain Research**. V. 139, p. 167-175. 2003.

MILLAN, M. J. et al. Blockade of serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{2A} receptors suppresses the induction of locomotor activity by 5-HT reuptake inhibitors, citalopram and fluvoxamine, in NMRI mice exposed to a novel environment: a comparison to other 5-HT receptor subtypes. **Psychopharmacology**, v. 168, n.4, p. 397–409. 2003.

MINEKA, S.; WATSON, D.; CLARK, L. A. Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders. **Annual Review of Psychology**, v. 49, p. 377-412, 1998.

MNIE-FILALI, O.; FAURE, C.; LAMBÁS-SEÑAS, L; MANSARI, M. E.; BELBLIDIA, H.; GONDARD E.; ETIÉVANT, A.; SCARNA, H.; DIDIER, A.; BEROD, A.; BLIER, P.; HADDJERI, N. Pharmacological blockade of 5-HT₇ receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1275–1288, 2011.

MONTI, J. M.; LEOPOLDO, M.; JANTOS, H. The serotonin 5-HT₇ receptor agonist LP-44 microinjected into the dorsal raphe nucleus suppresses REM sleep in the rat. **Behavioural Brain Research**. V. 191, p. 184-189. 2008.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. D. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24–40, 1999.

NANDAM, L. S.; JHAVERI, D.; BARTLETT, P. 5-HT₇, neurogenesis and antidepressants: a promising therapeutic axis for treating depression. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 5-6, p. 546–51, 2007.

NETTO, S. M.; SILVEIRA, R.; COIMBRA, N. C.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 26, p. 1135-41. 2002.

NEUMAIER, J. F.; SEXTON, T. J.; YRACHETA, J.; DIAZ, A. M.; BROWNFIELD, M. Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. V.21, P. 63-73. 2001.

NGAMPAMUAN, A.; BAUMERT, M.; BEIG, M. I.; KOTCHABHAKDI, N.; NALIVAICO, E. Activation of 5-HT_{1A} receptors attenuates tachycardia induced by restraint stress in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. V. 294, p. 132–141. 2007.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavioral**, v. 67, p. 325-330, 2000.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Attenuation of behavioral consequences of immobilization stress by intra-hippocampal microinjection of zimelidine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 26 (10), p. 1085-1089, 1993.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in a elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p.79-83, 2000.

PARKER, G.; BROTHIE, H. Major depression invites major concerns. v. 31, n. Supl I, p. 3–6, 2009.

PATKI, G.; SOLANKI, N.; ATROOZ, F.; ALLAM, F.; SALIM, S. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with decreased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Research**, v. 539, p. 73-86, 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Second edition. **Academic Press**. London. 1986.

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

PERHACH., J. L.; BARRY, H. Stress responses of rats to acute body or neck restraint. **Physiology and Behavior**. Vol. 5, pp. 443-448. 1970.

PORSOLT, R. D.; PICHON, M. L.; JALFRE, M. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266. 1977.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **American Journal of Psychiatry**. 149(8), p.999-1010, 1992.

ROBERTS, A. J.; HEDLUND, P. B. The 5-HT(7) receptor in learning and memory. **Hippocampus**, v. 22, n. 4, p. 762–71, 2012.

RUAT, M.; TRAFFORT, E.; LEURS, R.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; DIAZ, J.; ARRANG, J. M.; SCHWARTZ, J. C. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT7) activating cAMP formation. **Pharmacology**. V. 90. 1993.

SARGENT, P. A.; KJAER, K. H.; BENCH, C. J. et al. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C] WAY100635. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, p. 174–180, 2000.

SARKISYAN, G.; ROBERTS, A. J.; HEDLUND, P. B. The 5-HT(7) receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 1, p. 99–108, 2010.

SCHOEVERS, R. A.; BEEKMAN, A. T. F.; DEEG, D. J. H.; JONKER, C.; TILBURG, W. Comorbidity and risk-patterns of depression, generalised anxiety disorder and mixed anxiety-depression in later life: results from the AMSTEL study. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 18, p. 994-1001, 2003.

SELYE, H. SocietyThe Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its developmentfrom the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications ofsyntoxic and catatoxic hormones. **American Scientist**, v. 61, p. 692-99, 1973.

SELYE, H. confusion and controversy in the Stress Field. **Journal of Human Stress**, v. 1:2, p. 37-44, 1975.

STAHL, S. M. The serotonin-7 receptor as a novel therapeutic target.**The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 1414–5, 2010.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. **Brain Research**, v. 961, p. 109-120, 2003.

TO, Z. P.; BONHAUS, D. W.; EGLIN, R. M.; JAKEMAN, L. B. Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. **British Journal of Pharmacology**. V.115, p. 107-16. 1995.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **Journal of comparative neurology**. V. 407, p. 555-582. 1999.

VERTES, R. P.; KOCSIS, B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. **Neuroscience** Vol. 81, p. 893–926. 1997.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**.23, P. 265-271. 1998.

WESOŁOWSKA, A.; NIKIFORUK, A.; STACHOWICZ, K. Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. **European Journal of Pharmacology**. V. 553, p. 185–190. 2006(b).

WESOŁOWSKA, A.; NIKIFORUK, A.; STACHOWICZ, K.; TATARCZYNSKA, E. Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. **Neuropharmacology**. v. 51, p. 578-586. 2006(a).

WESOŁOWSKA, A.; TATARCZYŃSKA, E.; NIKIFORUK, A.; CHOJNACKA-WÓJCIK, E. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology**. V. 555, p. 43-47. 2007.

World Health Organization. Disponível em:

< <http://www.who.int/en/> >

YAU, J. L. W.; NOBLE, J.; SECKL, J. R. Acute restraint stress increases 5-HT₇ receptor mRNA expression in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**. V. 309, P. 141-144. 2001.

YUSOFF, M. S. B.; RAHIM, A. F. B.; BABA, A. A.; ISMAIL, S. B.; MAT PA, M. N.; ESA, A. R. Prevalence and associated factors of stress, anxiety and depression among prospective medical students. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 6, p. 128-133, 2013.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.231.53.9), intitulado "Papel de receptores 5-HT7 do Hipocampo Dorsal e do Núcleo Mediano da Rafe de ratos nas consequências comportamentais do estresse", de autoria de **Cláudia Maria Padovan**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP*, foi aprovado em reunião da CEUA de 31/03/2014.

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.231.53.9), entitled: "Papel de receptores 5-HT7 do Hipocampo Dorsal e do Núcleo Mediano da Rafe de ratos nas consequências comportamentais do estresse", by **Cláudia Maria Padovan** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, March, 31 2014.

Ribeirão Preto, 08 de Abril de 2014.

Prof. Dra. Ana Patricia Yatsuda Natsui
Vice Presidente da CEUA

Vanessa Bombonato Garcia
Secretária da CEUA