UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

PRISCILA REIS ABREU

**Papel dos receptores 5-HT_{1A} do Núcleo Mediano da Rafe na evocação da
memória aversiva em ratos submetidos ao desamparo aprendido**

RIBEIRÃO PRETO

2016

PRISCILA REIS ABREU

**Papel dos receptores 5-HT_{1A} do Núcleo Mediano da Rafe na evocação da
memória aversiva em ratos submetidos ao desamparo aprendido**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan

RIBEIRÃO PRETO

2016

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de documentação da FFCLRP
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Abreu, Priscila Reis

Papel dos receptores 5-HT_{1A} do Núcleo Mediano da Rafe na evocação da memória aversiva em ratos submetidos ao desamparo aprendido. Ribeirão Preto, 2016.

59 p.; il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Orientadora: Padovan, Cláudia Maria.

1. Depressão. 2. Desamparo Aprendido. 3. Núcleo Mediano da Rafe. 4. Receptores 5HT_{1a}. 5. Serotonina.

Nome: Abreu, Priscila Reis

Título: Papel de receptores 5-HT_{1A} do Núcleo Mediano da Rafe na evocação da memória aversiva em ratos submetidos ao desamparo aprendido.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

APROVADO EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof.Doutor _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.Doutor _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.Doutor _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedido à minha família. Minha fonte de amor e alegria! Amo muito vocês....

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan por ter me aceitado como sua orientanda. Agradeço também pela orientação na execução deste trabalho, pelos ensinamentos, disponibilidade e convívio diário.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho

Aos colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos! Dri, Jean, Will, Amanda, Pedro e Rodrigo muito obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar, pelas gargalhadas e pelas companhias nos almoços.

À minha turma querida do curso de aperfeiçoamento Mayra, João, Sara, Lê, Marcus e Alessandra.

À técnica Thalita pela amizade e auxílio na rotina dos experimentos.

À Renata Vicentini Del Moro pelos auxílios administrativos.

Ao Danilo, por compartilhar comigo mais uma conquista. Obrigada, Dani por todo seu carinho, seus conselhos e sobretudo o seu amor!

Aos meus pais, pelo constante incentivo, apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Poli e João pelo companheirismo e apoio de sempre.

Ao meu cunhado André, por acreditar no meu potencial e me incentivar fazer o mestrado.

À minha linda sobrinha e afilhada. Clarinha, você entou há pouco tempo na minha vida, mas, já ocupa um lugar gigante em meu coração. Te amo, corujinha.

À toda minha família: Vó Dith (in memorian) , Vô Zezito, todos primos e tios queridos! Amo muito vocês!

À família Buzzi e Monici: pelo carinho e hospitalidade de sempre.

À CAPS pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

À todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho.

RESUMO

Abreu P.R., Padovan C.M. (2016). *Papel dos receptores 5-HT1a do Núcleo Mediano da Rafe na evocação da memória aversiva em ratos submetidos ao desamparo aprendido*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

A depressão se constitui um transtorno de alta frequência mundial, apresentando como um dos fatores etiológicos, a exposição a eventos estressores. Em termos neurobiológicos, vários trabalhos da literatura sugerem a importância das projeções serotoninérgicas que partem do Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) para o Hipocampo Dorsal (HD) na adaptação ao estresse, a partir da desconexão das associações aversivas previamente aprendidas de suas consequências comportamentais. Assim, o presente trabalho apresenta como objetivo investigar o envolvimento dos receptores tipo 5-HT1a localizados no Núcleo Mediano da Rafe no processo de evocação de memórias aversivas. Para isso, ratos Wistar foram submetidos a cirurgia estereotáxica para a implantação de uma cânula-guia direcionada ao Núcleo Mediano da Rafe (NMnR). Passado o período de recuperação, os animais foram expostos a 40 choques inescapáveis (0,6mA; 10”) (condição experimental) em uma caixa de vai-e-vem. Após 24 h, os animais receberam duas injeções intracerebrais de Salina (Sal), 8OHDPAT (DPAT; 3nmoles/0,2µl; agonista de 5-HT1aR) e/ou WAY100635 (WAY; 0,3nmoles/0,2µl; antagonista de 5-HT1aR) combinadas de forma a compor os seguintes grupos experimentais: Sal+Sal, WAY+Sal, Sal+DPAT e WAY+DPAT. Cinco minutos após as injeções, todos animais foram submetidos a uma sessão de teste, na qual foram apresentados 30 choques elétricos escapáveis (0,4mA; 10”) nas patas, sinalizados por uma luz (15W; 20”) que permanecia acesa durante a apresentação dos choques. Durante a sessão teste foram registrados a latência, o número de esquivas, fugas, falhas e o total de cruzamentos. Um grupo controle também foi realizado, sendo que os animais foram apenas colocados na caixa, sem exposição a choques inescapáveis, sendo testados 24 h após. Os resultados foram analisados pela ANOVA de medidas repetidas. Também foi calculada porcentagem de animais desamparados (%DA) em cada condição, analisada pelo teste do Qui-quadrado. A pré-exposição a choques inescapáveis levou ao desenvolvimento de desamparo aprendido, efeito esse não atenuado pelo tratamento com DPAT, o que pode ser observado na elevada %DA em todos os grupos. Por outro lado, na condição controle, observou-se uma reduzida %DA para todos os tratamentos. Nossos resultados sugerem que a ativação de receptores de tipo 5-HT1a do NMnR não está envolvida na evocação de memórias aversivas.

Palavras-chave: Depressão. Desamparo Aprendido. Núcleo Mediano da Rafe. Receptores 5-HT1a, Serotonina.

ABSTRACT

Abreu, P.R., Padovan C.M. (2016). *Role of 5HT1-A receptors in the Raphe Median Nucleus in memorie evocation in rats submitted to learned helplessness*. Master degree. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The depression is a high-frequency disorder in the world, having as one of the etiological causes the exposure to stressful events. In neurobiological terms, several studies of literature suggest the importance of serotonergic projections from the Median Raphe Nucleus for dorsal hippocampus in adaptation to stress, from the disconnection of aversive associations previously learned of its behavioral consequences. Thus, the aim of this work is to investigate the involvement of 5-HT_{1a} receptors located in the Median Raphe Nucleus in the aversive memory recall process. For this, Wistar rats were submitted to stereotaxic surgery for the implantation of a guided cannula aimed to MnRN. After the recovery period, the animals were exposed to 40 inescapable shocks (0,6mA; 10 ") (experimental condition) in a shuttle box. After 24 h, the animals received two intracerebral injections of saline (Sal), 8OHDPAT (DPAT; 3nmol / 0,2 μ l; 5-HT_{1a}R agonist) and / or WAY100635 (WAY; 0,3nmol / 0,2 μ l; antagonist 5-HT_{1a}R) combined to compose the following groups: Sal + Sal + WAY Sal, Sal + DPAT and WAY + DPAT. Five minutes after the injections, all animals were submitted to a test session in which were presented 30 escapable electric footshocks (0,4mA; 10 ") signaled by a light (15W, 20") which remained on during the presentation of shock. During the test session were recorded latency for these responses, the number of avoidance, escape, failure and the total crossings. A control group was performed, and the animals just placed in the shuttle box, without exposing inescapable shocks. The results were analyzed by repeated measures ANOVA. It was also calculated percentage of helpless animals (%HA) in each condition analyzed by chi-square test. The pre-exposure to inescapable shocks led to the development of learned helplessness, this effect does not attenuated by treatment with DPAT, which can be observed in high % of all groups. On the other hand, in the control condition, there is a reduced % of all treatments. Our results suggest that activation of 5-HT_{1a} of NMnR is not involved in the evocation of aversive memories.

Key-words: Depression. Learned Helplessness. Median Raphe Nucleus. 5HT_{1a} receptors. Serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Linha do tempo dos procedimentos realizados no presente estudo.....	32
Figura 2- Tabela demonstrativa dos diferentes tratamentos realizados.....	33
Figura 3- Fotomicrografia do sítio de injeção intracerebral no Núcleo Mediano da Rafe.....	36
Figura 4- Representação esquemática dos sítios de injeções no Núcleo Mediano da Rafe.....	37
Figura 5- Média ($\pm$ EPM) da frequência de cruzamentos, esquivas e fugas emitidos pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no Núcleo Mediano da Rafe.....	39
Figura 6- Média ($\pm$ EPM) da frequência da resposta de falha e do tempo decorrido para emissão das respostas (latência) pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no Núcleo Mediano da Rafe.....	40
Figura 7- Efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de desamparo aprendido.....	41
Figura 8- Média ($\pm$ EPM) da frequência de cruzamentos, esquivas e fugas emitidos pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no Núcleo Mediano da Rafe.....	43
Figura 9- Média ($\pm$ EPM) da frequência da resposta de falha e do tempo decorrido para emissão das respostas (latência) pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no Núcleo Mediano da Rafe.....	44
Figura 10- Efeito dos tratamentos sobre a frequência de desamparo aprendido.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocoticotrópico
APA	American Psychiatric Association
Aq	Aqueduto cerebral
BT	Bloco de tentativa
CI	Choque inescapável
CE	Choque escapável
DA	Desamparo aprendido
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EPM	Erro padrão da média
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências de Letras de Riberão Preto
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HD	Hipocampo Dorsal
HDG	Hipótese Deakin & Graeff
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.c	Intra cerebral
i.p	Intra peritoneal
IMAO	Inibidores de monoaminoxidase
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LCE	Labirinto em cruz elevado
LNED	Laboratório de Neurobiologia do Estresse e Depressão
MAO	Monoamina oxidase
min	Minuto
mg	Miligrama
mm	Milímetro
NE	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NDR	Núcleo dorsal da rafe
OMS	Organização Mundial de Saúde
SAL	Salina

SNC	Sistema Nervoso Central
TDM	Transtorno Depressivo Maior
USP	Universidade de São Paulo
5-HT	Serotonina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2 (di-n-amino-propilamina) tetralina
%DA	Porcentagem de desamparo aprendido

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	25
3.2 Aspectos éticos.....	27
3.3 Fármacos.....	27
3.4 Equipamentos e insumos	28
3.5 Efeitos comportamentais do tratamento com 8-OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos submetidos ao desamparo aprendido.....	29
3.5.1 Cirurgia estereotáxica.....	29
3.5.2 Exposição a caixa com choques inescapáveis	30
3.5.3 Exposição à caixa (sem choques).....	31
3.5.4 Exposição aos choques escapáveis.....	31
3.5.5 Procedimento de injeção.....	32
3.5.6 Perfusão.....	33
3.5.7 Análise histológica.....	34
3.5.8 Análise estatística	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Representação esquemática dos sítios de injeções no Núcleo Mediano da Rafe.....	36
4.2 Fotomicrografia dos sítios de injeções no Núcleo Mediano da Rafe.....	37
4.3 Efeitos comportamentais do tratamento intra-NmnR com 8OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos expostos aos choques inescapáveis.....	38

4.4 Efeitos comportamentais do tratamento intra-NmnR com 8OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos não expostos aos choques inescapáveis.....	42
5.DISSCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO.....	53
7.REFERÊNCIAS.....	54

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos de humor constituem uma categoria diagnóstica de alta prevalência mundial. De acordo com a Associação Psiquiatra Americana, esses transtornos são caracterizados por mudanças patológicas episódicas no estado emocional, associadas a anormalidades na cognição e no comportamento (American Psychiatric Association, 2014).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), os transtornos de humor são divididos em transtornos unipolares, que incluem a depressão maior e a distímia (depressão menor intermitente) e transtornos bipolares, que incluem o transtorno bipolar (desordem maníaco-depressiva) e a ciclotímia (forma branda da desordem bipolar caracterizada por episódios de hipomania e depressão alternados) (American Psychiatric Association, 2014).

Dentre os transtornos de humor acima abordados, o transtorno depressivo destacam-se por ser uma das doenças neuropsiquiátricas mais frequentes no mundo ocidental.

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) ou depressão, como é popularmente conhecida, consiste na persistência de humor deprimido ou anedonia (perda de interesse/prazer) acompanhado por pelo menos cinco ou mais dos sintomas adicionais de depressão (mudanças somáticas no apetite, no sono, na energia e no desejo sexual, alterações no peso, nas atividades psicomotoras, sentimentos de desvalia ou culpa, dificuldades para pensar, concentrar-se ou tomar decisões, pensamentos sobre morte ou ideação suicida) por um período mínimo de duas semanas (American Psychiatric Association, 2014).

De acordo com levantamentos realizados pela Organização Mundial de Saúde em 2012, o TDM é atualmente a principal causa de incapacitação funcional em todo o mundo, e afeta cerca de 350 milhões de pessoas (Ferrari et al., 2013).

Quando comparada às principais condições médicas crônicas, a depressão só tem equivalência em incapacitação às doenças isquêmicas cardíacas graves (Wells et al., 1989). Em função dessa incapacidade promovida, dos gastos com o tratamento e dos inúmeros custos indiretos envolvidos, o TDM custou 210,5 bilhões de dólares nos Estados Unidos no período de 2005 a 2010 (Greenberg et al., 2015).

No que se refere ao tratamento farmacológico da depressão, sua revolução aconteceu a partir da década de 50, com a descoberta casual de duas classes de agentes com propriedade antidepressivas: inibidores da monoaminoxidase (IMAO) e antidepressivos tricíclicos. A descobertas dos IMAOS ocorreu após a observação que pacientes tuberculosos tratados com a iproniazida apresentavam melhora do humor e ao investigar seu mecanismo de ação, constatou-se que tal droga além de tuberculostática, também inibe a enzima monoaminoxidase. Já o uso dos antidepressivos tricíclicos teve início a partir da síntese de imipramina e da descoberta de seus efeitos antidepressivos, após a evidência de que pacientes esquizofrênicos com sintomas depressivos melhoravam de humor. Com base no conhecimento sobre o mecanismo de ação da iproniazida e a imipramina e a partir de outras evidências clínicas, Joseph Schildkraut e Seymour Kety em 1960, formularam a hipótese noradrenérgica, que pressupõe a depressão como consequência de uma diminuição de atividade noradrenérgica (Guimarães, 1999). Posteriormente, surgiu a hipótese serotoninérgica proposta por Lapin e Oxenkrug (1969), após a realização de estudos *post-mortem* em vítimas de suicídio que constataram alterações em inúmeros marcadores adicionais de serotonina (Del Porto et al. 2009). De acordo com essa hipótese, a depressão também estaria relacionada com uma diminuição da atividade serotoninérgica, contribuindo com os estudos prévios acerca da etiologia da depressão. Em conjunto, as duas hipóteses deram origem a Teoria Clássica da Depressão.

A partir da década de 1980, foram introduzidos na clínica novos compostos, como os inibidores de recaptação de serotonina. Apesar de não apresentar vantagens em termos de

eficácia clínica em relação aos medicamentos mais antigos, sua melhor tolerabilidade fez que se tornasse um dos grupos farmacológicos mais prescritos nessa última década (Guimarães, 1999).

Em se tratando da serotonina (5-Hidroxitriptamina- 5HT), é uma amina biogênica que foi identificada em 1945, como sendo um vasoconstritor sérico, liberado na corrente sanguínea após a ruptura de plaquetas. Em 1948, essa substância foi isolada e caracterizada por Maurice Rapport (Hannon; Hoyer, 2008). Posteriormente, foi constatada a presença de 5-HT no sistema nervoso central (SNC) onde, apesar das concentrações relativamente baixas quando comparado a outros tecidos, atua como um importante neurotransmissor (Lowry et al., 2008). Sua atuação no SNC está envolvida na modulação de várias funções fisiológicas e comportamentais, tais como o humor, sono, dor, apetite, agressão, comportamento sexual e ansiedade (Murphy et. al., 1998). Esta complexa ação da 5HT é mediada por uma ampla família de receptores (Hoyer et al, 2002).

Até o momento, 14 subtipos de receptores de serotonina foram identificados e classificados em sete grande famílias, de acordo com critérios farmacológicos e estruturais. São elas: 5-HT1, 5HT2, 5HT3, 5-HT-4, 5HT5, 5HT6 e 5HT7.

Dentre os subtipos de receptores acima abordados, o 5-HT1a é considerado um importante receptor nos processos de desenvolvimento, tais como crescimento, migração neuronal e formação de sinapses, apresentam-se como mediadores chaves na sinalização serotoninérgica e estão relacionados a respostas fisiológicas específicas como, modulação da atividade neuronal, liberação de neurotransmissor e mudança comportamental. O receptor 5-HT1a foi um dos primeiros receptores de 5-HT a ser clonado e sequenciado e um dos primeiros farmacologicamente caracterizados (Barnes & Sharp 1999). Esse receptor desempenha dupla função, de acordo com a localização, na pré ou pós-sinapse (Klein, 2010) e são considerados

importantes por estarem, possivelmente, envolvidos na regulação de comportamentos emocionais e afetivos e no mecanismo de ação dos agentes terapêuticos usados na ansiedade (Graeff, 1997).

Apesar das hipóteses monoaminérgicas representarem um avanço na compreensão dos mecanismos biológicos que dão origem a depressão, estas não explicam totalmente a patogênese dos distúrbios de humor. Evidências derivadas de estudos epidemiológicos demonstraram que fatores ambientais como exposições a situações estressantes também podem desencadear transtornos mentais, particularmente o Transtorno de Depressão Maior. De acordo com estudo conduzido por Robert M. Post em cerca de 60% dos casos clínicos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes (Post, 1992).

A palavra estresse foi introduzida inicialmente na física para traduzir o grau de deformidade sofrido por um material quando submetido a um esforço ou tensão. Em 1926, Hans Selye transpôs esse termo para a medicina e biologia para descrever uma ameaça real ou potencial à homeostasia. (Seyle, 1936). Embora Seyle, se ateu somente aos efeitos de estressores físicos, ele delineou o papel da glândula pituitária na estimulação do córtex adrenal pelo hormônio adenocorticoide abrindo caminho para o conceito do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Graeff, 2003).

Durante um episódio de estresse, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é ativado, os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o hormônio corticotrófico (CHR), o qual leva a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por fim estimula a adrenal a produzir o corticosteróide. O cortisol então é liberado no sangue e atinge a região hipocampal (Herman & Cullinan, 1997).

Baseados nos diferentes resultados obtidos com a administração sistêmica ou central de serotonina, Deakin e Graeff (1991) propuseram uma hipótese que sugere um papel dual da

serotonina na modulação de respostas defensivas, levando em consideração diferenças anatômicas e funcionais das vias serotoninérgicas e os diferentes subtipos de receptores envolvidos. De acordo com estes pesquisadores, a via serotoninérgica que se origina do Núcleo Dorsal da Rafe e inerva a amígdala e o córtex pré-frontal facilitaria os comportamentos de esquiva, em resposta a ameaças potenciais e distais. Por outro lado, projeções a receptores 5-HT1A, hipocâmpais originadas no NMnR exerceriam um importante papel na adaptação ao estresse crônico. A via serotoninérgica NMnR – Hipocampo Dorsal seria, então, responsável por desconectar as associações aversivas das consequências comportamentais delas decorrentes. Problemas nessa via ocasionariam o desenvolvimento de patologias relacionadas ao estresse, como a depressão, sendo a base do desenvolvimento tanto do desamparo aprendido em animais quanto em humanos. Sendo assim, o hipocampo e o NMnR exercem importantes papéis na neurobiologia da depressão. Na visão desses autores, o hipocampo é considerado a estrutura central de um “sistema de resiliência” que separaria as tarefas cotidianas dos eventos aversivos, permitindo o controle de situações estressantes. O NMnR se constitui a principal fonte de inervação serotoninérgica para o hipocampo dorsal (Vertes, 1999). Suas células serotoninérgicas são organizadas em duas regiões: central e paramediana da rafe. A região central é composta por grande quantidade de pequenas células com dendritos curtos e em sua maioria alinhadas no plano médio-sagital, já os neurônios da região paramediana são pouco organizados e não apresentam qualquer tipo de orientação (Tork, 1990).

Além de inervar o hipocampo dorsal, o NMnR também inerva o septo medial, núcleo acumbens (centro), área tegmental ventral, amígdala central (CeA) e amígdala basolateral (BLA), além de diversos núcleos hipotalâmicos como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), a área hipotalâmica lateral (LH), o núcleo arqueado (ARC) e o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN) (Vertes et al., 1999).

Diversas pesquisas foram realizadas com a finalidade de investigar a funcionalidade do NMnR, com destaque para as que descreveram aumento da atividade locomotora e da reatividade a alterações ambientais decorrentes da inativação por lesão eletrolítica (Jacobs et al, 1974).

Considerando a importância dos diferentes mecanismos neurobiológicos envolvidos no Transtorno Depressivo e sua possível correlação com episódios estressantes, os modelos animais experimentais desempenham um importante papel nesse contexto.

Existem vários modelos animais de depressão, porém os mais utilizados são o Nado forçado, o Desamparo Aprendido, o Estresse Crônico Suave (Murua et al., 1991), Campo Aberto ou o Estresse de Restrição Forçada seguido do Labirinto em Cruz Elevado (Padovan, 2000). Dentre esses testes comportamentais, o modelo de Desamparo Aprendido proposto por Seligman e colaboradores (Overmeier & Seligman, 1967, Seligman & Maier, 1967), foi amplamente validado como um modelo de depressão. O desamparo aprendido define-se pela dificuldade de aprendizagem por sujeitos previamente expostos a eventos aversivos incontroláveis quando submetidos a uma condição na qual o agente estressor é passível de controle (Maier & Seligman, 1976). Neste modelo, ratos são colocados em uma caixa onde são submetidos a choques elétricos inescapáveis nas patas e 24 horas após, são colocados a nova situação na qual se torna possível esquivar ou fugir do estímulo aversivo.

Os animais que passam por esse procedimento apresentam redução da atividade locomotora, grooming, diminuição do apetite, do interesse sexual, e demonstram déficits de aprendizagem (O'neil & Moore, 2003). No que se refere ao último prejuízo, estes correspondem a dificuldade que os indivíduos apresentam em escapar dos choques previamente sinalizados, quando estes são apresentados após a exposição de choques de natureza incontrolável. O efeito produzido pela incontrolabilidade do choque tem sido denominado “Desamparo Aprendido”

(Maier & Seligman, 1976). Entretanto, esse efeito comportamental pode ser revertido por tratamentos crônicos com antidepressivos tricíclicos, atípicos, inibidores seletivos da recaptação de 5-HT ou inibidores da monoaminoxidase (IMAO), quando estes são administrados após a exposição aos choques inescapáveis. (Porsolt et al., 1991). Sendo assim, os estudos pré-clínicos em animais podem nos fornecer informações valiosas quanto ao funcionamento neuronal global não acessível em pesquisas com humanos, e potencialmente podem ajudar a identificar novas áreas para o desenvolvimento de drogas antidepressivas (O'neil & Moore, 2003). Nesse sentido, o modelo do DA tem sido usado tanto no estudo da neurobiologia da depressão quanto no desenvolvimento de novos antidepressivos (Maier; Watkins, 1998).

Seguindo essa mesma linha de pesquisa, Joca et al (2003), demonstraram que a administração de zimelidina na formação hipocampal foi capaz de impedir o desenvolvimento do desamparo aprendido em ratos pré-expostos a choques elétricos inescapáveis (Joca et al., 2003). Portanto, esses estudos corroboram com a hipótese de Deakin e Graeff (1991) ao sugerirem que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5HT1aR pós sinápticos no hipocampo dorsal está envolvida na adaptação ao estresse inescapável, atenuando as consequências comportamentais da exposição ao estresse.

Considerando a importância da Via NMnR-HD na modulação de respostas diante de eventos aversivos, estudos vem sendo realizados a fim de elucidar os mecanismos serotoninérgicos do NMnR e sua participação na presença de estressores. Estudos de Avanzi e Brandão (2001), demonstraram que a microinjeção de 8-OH DPAT no NMnR causou uma significativa redução das respostas de congelamento em ratos submetidos ao paradigma de medo condicionado contextual. (Avanzi & Brandão, 2001). Neste mesmo ano, Andrade et al.(2001) demonstraram que a lesão no NMnR promoveu efeitos ansiolíticos em animais imobilizados e submetidos ao LCE. (Andrade et al, 2001).

Em relação ao momento que a intervenção farmacológica é realizada, vários trabalhos na literatura sugerem a existência de uma circuitaria temporal essencial para os processos de aquisição, consolidação e evocação de memórias. Em resumo, os trabalhos sugerem que, dependendo do momento em que a intervenção farmacológica ocorre, e também da estrutura cerebral onde essa intervenção é realizada, esses processos relacionados a memória serão alterados (Izquierdo & Medina, 1997).

Utilizando o modelo de restrição forçada seguido do teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Netto e Guimarães (1996) mostraram que o tratamento com 8-OH-DPAT (agonista serotoninérgico do tipo 5-HT_{1A}R) no NMnR interfere no processo de consolidação da memória aversiva, levando à atenuação dos efeitos do estresse. (Netto & Guimarães, 1996). Entretanto, estudos conduzidos por Carli et al. (1993) não observaram efeito antidepressivo com o tratamento intra-hipocampal com 8-OH-DPAT quando este foi administrado anteriormente ao teste do nado forçado em ratos previamente estressados (Carli et al., 1993).

Ao considerar o conjunto de evidências apresentadas, temos como hipótese que a facilitação serotoninérgica via receptor 5 HT_{1a}R no NMnR promova a atenuação dos efeitos do estresse através da desconexão das memórias aversivas.

Partindo da mesma hipótese, um estudo recente realizado em nosso laboratório por Martins e Padovan (em preparação), investigou a influência da manipulação farmacológica de receptores do 5-HT_{1A} no NMnR em ratos submetidos ao modelo de desamparo aprendido durante o processo de aquisição e consolidação da memória aversiva, sendo realizada a intervenção imediatamente antes ou após a exposição dos choques inescapáveis. O referido estudo apresentou como resultado que a ativação de receptores 5HT_{1a}, promoveu a atenuação dos déficits cognitivos decorrentes da exposição aos choques inescapáveis durante o processo de aquisição da memória aversiva porém, no momento da consolidação, não foram observadas

diferenças estatísticas no que se refere ao desempenho comportamental dos sujeitos experimentais, sugerindo assim, que a intervenção farmacológica não ocasionou a atenuação dos efeitos da exposição aos choques incontroláveis. No entanto, não foram investigados os efeitos da intervenção farmacológica realizada, minutos antes do teste, ou seja durante a evocação da memória aversiva.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel de receptores 5-HT1A no Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) na evocação de memórias aversivas em animais submetidos ao modelo de desamparo aprendido.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 98 ratos Wistar machos com aproximadamente sete semanas de idade provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto.

No biotério do laboratório, os animais foram alojados aos pares, em microisoladores (35x19x25cm) forrados com maravalha e livre acesso à água e a ração.

O biotério do laboratório dispõe de sistema de ar condicionado com temperatura controlada ($23\pm1^{\circ}\text{C}$); ciclo claro-escuro 12h/12h (início do período claro às 6:30 am) e sem controle da umidade relativa do ar.

3.2 Aspectos Éticos

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo 2014.1.231.53.9).

3.3 Fármacos:

Os seguintes fármacos e reagentes foram utilizados nos experimentos:

❖ Cirurgia Estereotáxica:

- anestésico geral 2, 2, 2-tribromoetanol a 2,5% (Sigma-Aldrich, 250mg/kg, a 10ml/kg; administrado por via intraperitoneal - i.p.) diluído em água destilada;
- anestésico local cloridrato de lidocaína (Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,2mg/ml, a 0,2ml/animal; administrado por via subcutânea - s.c.) associado a vasoconstritor noradrenalina 0,04%;

- antiinflamatório, analgésico e antitérmico flunixinina meglumina, 1,25mg/ml (Banamine Injetável; Schering-Plough; 1,25mg/kg, a 1ml/kg de peso corporal; via s.c.);
 - associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico Veterinário Fort Dodge; 24.000UI de benzilpenicilina benzatina, 12.000UI de benzilpenicilina procaína, 12.000 UI de benzilpenicilina potássica, 10 mg de diidroestreptomicina base e 10 mg de estreptomicina base; dose única de 0,2 mL por via intramuscular.
- ❖ **Estudos Comportamentais:** WAY100635 (SIGMA-ALDRICH; antagonista de 5-HT_{1a}R; 0,3 nmol/0,2µl) e 8-OH-DPAT (SIGMA-ALDRICH; agonista de 5-HT_{1a}R; 3 nmoles/0,2µl)
- ❖ **Perfusão:** anestésico geral uretana (SIGMA-ALDRICH), 1,25g/kg, 25%, 5ml/kg de peso corporal, administrado por via intraperitoneal) diluído em água destilada.

3.4 Equipamentos e insumos:

- ❖ Cirurgia: aparelho estereotáxico (Stoelting), cânulas de ácido inoxidável (14 mm), parafusos, mandris de aço inoxidáveis, seringas (1ml e 3 ml), pinça, tesoura, bisturi, espátula e pipeta “Pasteur”.
- ❖ Injeção intracerebral: agulhas gengivais 30 G de 15 mm (BD Precision Glide 0,60 x 25mm) acopladas a segmentos de polietileno em seringas Hamilton de 10 µl manipuladas através de bomba de infusão para administração central (Insight e KdScientific).
- ❖ Desamparo Aprendido: 2 caixas de vai-e-vem de acrílico, (Insight Ltda., modelo EP-111), as quais são divididas em dois compartimentos de 24 x 27 x 30 (cm) cada, separados por uma parede de acrílico que possui uma abertura central permitindo

a passagem do animal de um compartimento ao outro. O piso inferior de ambos os compartimentos é confeccionado em barras de aço inox, onde são liberados choques de intensidade e frequência variáveis. Cada caixa é composta de sensores infravermelhos que detectam os cruzamentos dos animais. As caixas são acopladas ao *software* Esquiva Ativa 3.8.9.1 (Insight) e colocadas dentro de caixas de isolamento acústico (Bonther Equipamentos), com sistema de exaustão individual.

3.5 Efeitos comportamentais do tratamento com 8-OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos submetidos ao desamparo aprendido

Ao chegarem ao Laboratório de Neurobiologia de Estresse e Depressão (LNED), os animais permaneceram dois dias no biotério para habituação até a realização dos procedimentos descritos a seguir.

3.5.1 Cirurgia estereotáxica

Neste procedimento, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg) via intraperitoneal (i.p). Após a tricotomia, foram fixados a um aparelho estereotáxico pelo rochedo temporal e incisivos superiores, com a barra dos incisivos a -3,3mm abaixo da linha intraneural. Em seguida foi feita a assepsia e administração subcutânea do anestésico local Lidostesin (0,2ml, dose única, cloridato de lidocaína 3% com vasoconstritor associado) e também da associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fort Dodge, 240.000 UI; 0,2mL/animal; i.m.) e do anti-inflamatório, analgésico e antitérmico flunixinina meglumina (Banamine Injetável; Schering-Plough; 2,5mg/kg, a 1ml/kg de peso corporal; s.c.) depois da limpeza dos respectivos locais de administração. Após esses procedimentos, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e o periósteo foi removido. Após esses procedimentos, com o

auxílio de uma broca, dois orifícios foram feitos nos ossos parietal e frontal para a fixação de parafusos de aço inoxidável para ancorar a prótese colocada no animal. Um terceiro orifício foi feito seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1997) para o implante de uma cânula guia (14mm) direcionada ao NMnR (ântero-posterior: -7,3; lateral: 2,7; profundidade: -7,8; inclinação da haste: 18°). Após a implantação da cânula e sua fixação com acrílico autopolimerizável, um mandril de aço inoxidável foi introduzido em seu interior, a fim de evitar seu entupimento.

Após a cirurgia, permaneceram aos pares em microisoladores em rack ventilada recuperando no biotério por um período de sete dias, quando então, foram submetidos aos procedimentos experimentais, descritos a seguir.

3.5.2 Exposição a caixa com choques inescapáveis

Após o período de habituação, os animais que tinham como procedimento a exposição aos choques inescapáveis nas patas, foram colocados na caixa de Esquiva Ativa durante 3 minutos para ambientação ao local e livre exploração. Após esse tempo, foram submetidos ao esquema de apresentação de estímulos, baseados em estudos prévios descritos na literatura e em experimentos já realizados anteriormente no Laboratório de Neurobiologia do Estresse e Depressão. O referido esquema foi composto por 40 trials, sendo que cada trial consistiu na apresentação de um choque elétrico inescapável (CI;0,6mA de intensidade, 10 segundos de duração), seguido de um intervalo variável (60 ± 30 segundos). Terminado a sessão de choques inescapáveis, foi realizado a assepsia do local com álcool 70% e os animais foram levados de volta ao biotério.

3.5.3 Exposição à caixa sem choques inescapáveis

Os animais que não tinham como procedimento a exposição aos choques inescapáveis (grupo controle), foram submetidos a exposição a caixa de Esquiva Ativa para a habituação ao novo ambiente. Durante essa etapa, os sujeitos permaneceram 20 minutos na caixa, com o sistema de choques inativado.

3.5.4 Exposição aos choques escapáveis

Nesta sessão, todos animais foram colocados em caixa distinta da qual foi colocado no dia anterior, a fim de não haver interferência do contexto. As caixas se diferenciavam quanto a apresentação ou ausência de litras. Ao serem alocados nas caixas, foram submetidos aos choques escapáveis, correspondendo ao período de 24 horas após a exposição aos choques inescapáveis ou a exposição à caixa de Esquiva Ativa. Este procedimento consistiu na apresentação de 30 trials consecutivos, os quais foram compostos pela apresentação 30 choques escapáveis (CES; 0,4mA de intensidade, 10 segundos de duração), e sinalizados por uma luz de 15W que se iniciou dez segundos antes da apresentação do choque, terminando simultaneamente com o mesmo. Em seguida foram apresentados intervalos variáveis de 60 ± 30 segundos.

Durante a sessão de administração de choques elétricos, o software Esquiva Ativa 3.8.91 registrou o número de cruzamentos, esquivas, fugas, falhas emitidas por cada animal e também o tempo que cada animal gastou para emitir determinada resposta (latência).

As respostas de esquiva foram registradas quando os animais atravessavam a caixa durante a presença da luz (10 segundos) que antecedia o estímulo aversivo (choque). Já a resposta de fuga ocorreu quando os animais emitiram o mesmo comportamento na presença

simultânea da luz e do choque, havendo a interrupção do mesmo. A falha foi detectada quando o sujeito não emitia nenhuma resposta de cruzamento no tempo equivalente a 20 segundos. O número de falhas iguais ou superiores a dez indicavam a presença de desamparo aprendido. Esse critério foi estabelecido a partir de estudos prévios realizados no Laboratório de Neurobiologia do Estresse e Depressão e de estudos provenientes da literatura.

Na figura abaixo (figura 1) contém a linha de tempo dos procedimentos realizados neste estudo:

Figura 1. *Desenho do protocolo experimental do estudo “Efeitos comportamentais do tratamento com 8-OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos submetidos ao desamparo aprendido”.*

3.5.5 Procedimento de injeção

As drogas foram administradas previamente a exposição dos animais a sessão de choques escapáveis. Cada animal recebeu duas injeções intracerebrais no NMnR, com o intervalo de cinco minutos entre cada uma, de salina (0,2 µl), 8OH-DPAT (3 nmoles/ 0,2 µl) e WAY100635 (0,3 nmoles/ 0,2 µl) combinadas de forma a comporem os seguintes grupos experimentais:

1 ^a injeção	2 ^a injeção
Salina	Salina
Salina	8OH-DPAT
Way 100635	Salina
Way 100635	8OH-DPAT

Figura 2. *Tabela demonstrativa dos tratamentos realizados.*

3.5.6 Perfusão

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana 25% (Sigma-Aldrich, USA, 1,25g/kg, 5ml/kg; i.p.) e as cavidades torácica e abdominal expostas. Uma agulha foi colocada no ventrículo esquerdo do animal, rompendo-se o ventrículo direito, para perfusão com solução salina (250ml) seguida de solução de paraformaldeído 10% (100ml).

Após o término da perfusão, os encéfalos foram removidos e colocados em uma solução de formaldeído 10% por 2h. Posteriormente, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 30% em PBS 0,1M por um período de 48h e então levados criostato e cortados em sessões de 50 micrômetros de espessura.

3.5.7 Análise Histológica

Após a realização dos cortes e a confecção das lâminas histológicas, foi realizada a verificação dos sítios de injeção. A localização das cânulas foi determinada por comparação com os diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2008). Realizada a histologia, os animais que apresentaram as injeções confirmadas no NMnR foram submetidos à análise estatística.

3.5.8 Análise estatística:

Os trinta ciclos do teste foram agrupados em seis blocos (BTS), resultando na composição de cinco ciclos em cada bloco, para cada uma das variáveis analisadas. Foi utilizada a variância (ANOVA) de uma via, sendo um valor de P igual ou menor que 0,05 considerado significativo.

Para a realização da análise estatística referente ao desamparo aprendido, foi calculada a porcentagem de animais desamparados em cada grupo. Para tanto, foram considerados como desamparados os animais que apresentaram dez ou mais respostas de falhas. Em seguida esses dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado, tendo como valores significativos quando o valor de P fosse igual ou menor que 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Representação esquemática dos sítios de injeções no Núcleo Mediano da Rafe:

Figura 3: Representação esquemática dos pontos de injeção i.c no NMnR em diagramas do atlas Paxinos e Watson (2008). Os círculos representam os pontos de injeções confirmadas no NMnR. Os triângulos representam os sítios de injeções fora do NMnR. Os círculos não equivalem ao número total de animais utilizados no estudo devido à sobreposição de pontos. Aq= Aqueduto cerebral.

4.2 Fotomicrografia dos sítios de injeções no Núcleo Mediano da Rafe:

Na figura abaixo (figura 4), encontra-se uma fotomicrografia representativa dos sítios de injeção no Núcleo Mediano da Rafe.

Figura 4. Fotomicrografia do sítio de injeção intracerebral no Núcleo Mediano da Rafe (NMnR). Nesta figura observa-se o aqueduto cerebral representado por aq.

4.3 Efeitos comportamentais do tratamento intra-NmnR com 8OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos expostos aos choques inescapáveis

Nas figuras 5 e 6, estão apresentados os efeitos da administração de Salina+Salina (Sal+Sal), Salina+8OHDPAT (Sal+DPAT), WAY100635+Salina (WAY+Sal) e WAY100635+8OHDPAT (WAY+DPAT), sobre as médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) das variáveis: cruzamentos, esquivas, fugas, falhas e latência.

A Anova de uma via revelou diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados e os fatores cruzamentos ($F_{3,45}=1,246$; $p>0,05$), esquiva ($F_{3,45}=0,850$ $p>0,05$), fuga ($F_{3,45}=0,626$ $p>0,05$), falhas ($F_{3,45}=0,924$; $p>0,05$) e latência ($F_{3,45}=1,117$; $p>0,05$).

Figura 5. Média ($\pm$ EPM) da frequência de cruzamentos, esquivas e fugas emitidos pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no NMnR. As médias são referentes aos cinco ciclos consecutivos que compõem cada bloco de tentativa (BT). A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via com $p < 0,05$.

Figura 6. Média ($\pm$ EPM) da frequência da resposta de falha e do tempo decorrido para emissão das respostas (latência) pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no NMnR. As médias são referentes aos cinco ciclos consecutivos que compõem cada bloco de tentativa (BT). A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via com $p < 0,05$.

No gráfico abaixo (figura 7) são mostradas as porcentagens de desamparo aprendido (DA%) em função dos tratamentos no grupo experimental. Não houve efeito dos tratamentos para as porcentagens de desamparo aprendido ($X^2=2,749$, $n=49$; $gl=3$; $p>0,05$).

Figura 7. *Efeitos comportamentais do tratamento intra-NmnR com 8OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos expostos aos choques inescapáveis.* Os números na parte superior das barras representam a quantidade de animais pertencentes a cada grupo de tratamento.

4.4 Efeitos comportamentais do tratamento intra-NmnR com 8OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos não expostos aos choques inescapáveis

Os gráficos a seguir (figuras 8 e 9) apresentam as médias $\pm$ EPM do número de cruzamentos, esquivas e fugas emitidos pelos sujeitos de acordo com cada tipo de tratamento intracerebral. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos BTS de cruzamentos ($F_{3,45}=0,340$), esquivas ($F_{3,45}=0,4$; $P>0,05$) fugas ($F_{3,45}=1,722$; $P>0,05$), falhas ($F_{3,45}=1,058$; $P>0,05$) e latências ($F_{3,45}=0,376$; $P>0,05$).

Figura 8. Média ($\pm$ EPM) da frequência de cruzamentos, esquivas e fugas emitidos pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no NMnR. As médias são referentes aos cinco ciclos consecutivos que compõem cada bloco de tentativa (BT). A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via com $p < 0,05$.

Figura 9. Médias ($\pm$ EPM) da frequência da resposta de falha e do tempo decorrido para emissão das respostas (latência) pelos animais pelos animais submetidos aos diferentes tratamentos i.c no NMnR. As médias são referentes aos cinco ciclos consecutivos que compõem cada bloco de tentativa (BT). A análise estatística utilizada foi a ANOVA de uma via com $p < 0,05$.

A figura abaixo (figura 10) apresenta as porcentagens de desamparo aprendido (DA%) em função dos tratamentos no grupo experimental no grupo controle. Não houve efeito dos tratamentos para as porcentagens de desamparo aprendido ($X^2=4,726$, $n=49$; $gl=3$; $p>0,05$).

Figura 10. *Efeitos comportamentais do tratamento intra-NmnR com 8OHDPAT e/ou WAY100635 na evocação de memórias aversivas em ratos não expostos aos choques inescapáveis.* Os números na parte superior das barras representam a quantidade de animais pertencentes a cada grupo de tratamento.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O modelo de desamparo aprendido, proposto por Seligman, sugere que a variável controlabilidade exerce influência sobre a aprendizagem de respostas de fuga ou esquiva diante da apresentação de estímulos estressores (Seligman & Maier, 1967).

Estudos realizados utilizando este modelo animal apontam que a exposição prévia a choques incontroláveis produzem déficits cognitivos em ratos, quando são expostos posteriormente a uma condição onde é possível esquivar ou fugir dos choques. (Maier, 1970; Overmier & Seligman, 1967).

Em nosso estudo, o grupo que foi exposto aos choques inescapáveis apresentou uma dificuldade de aprendizagem das tarefas de fuga e esquiva quando comparados com o grupo que não foi exposto a essa variável. Como consequência do déficit de aprendizagem, os animais que receberam os choques incontroláveis, pouco responderam ao ambiente, emitindo alta frequência de falhas e baixa frequência de cruzamentos, resultando em uma alta porcentagem de animais desamparados. Portanto, os nossos resultados estão de acordo com dados prévios da literatura (Joca et al., 2003; Martin et al., 1990). Os presentes resultados também corroboram com a hipótese na qual a exposição a eventos aversivos incontroláveis induz alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes aos encontrados na depressão humana (Anisman & Zacharko, 1992).

Quanto ao tratamento com 8-OH-DPAT intra-NMnR, estudos demonstram que esse agonista serotoninérgico ativa receptores do tipo 5-HT_{1A} inibindo o disparo de neurônios serotoninérgicos do NMnR, que se projetam no hipocampo, através da ativação de autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} (Hjorth & Sharp, 1991). Os receptores de serotonina do tipo 1A afetam os processos de aprendizagem e memória, pois além de influenciar a atividade de neurônios glutamatérgicos, colinérgicos e gabaérgicos em estruturas relacionadas

aos processos de armazenamento de memória (hipocampo, projeções septohipocampais, córtex cerebral), atuam também nas proteínas Kinases, responsáveis por parte do processo gênico relacionado com a formação de memórias (Ögren et al., 2008). Baseado nessas evidências, partimos da hipótese de que ativação de receptores do tipo 5-HT_{1A} intra NMnR promove um melhor desempenho desses animais diante da exposição aos choques elétricos escapáveis a partir da intervenção farmacológica na formação de memórias aversivas. No entanto, nossos resultados mostram que não houve diferenças quanto ao desempenho nas tarefas comportamentais. O presente dado apontou uma ausência de efeito do agonista 8-OH-DPAT em atenuar os déficits provenientes da exposição aos choques inescapáveis. Estes achados também contrariam estudos prévios do nosso laboratório, os quais sugerem que o tratamento deste agonista intra-NMnR foi eficaz em atenuar os efeitos comportamentais causados pela exposição ao modelo do Nado Forçado durante o processo de aquisição, consolidação e evocação da memória (Almeida et al., 2013). Somado a esses dados, estudos recentes realizados por Martins e Padovan em nosso laboratório, empregando o modelo de Desamparo Aprendido, também demonstraram que o 8-OH-DPAT foi capaz de prevenir o desenvolvimento do desamparo aprendido em animais previamente expostos aos choques incontroláveis quando, estes foram expostos posteriormente aos choques escapáveis. O presente resultado não foi observado quando a intervenção farmacológica foi realizada após a apresentação dos choques inescapáveis. Neste grupo os animais tratados com Salina + 8-OH-DPAT indicou uma tendência do agonista em reverter o desamparo aprendido, entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os desempenhos dos animais nos tratamentos realizados com agonista e/ou antagonista de 5-HT_{1A}, sugerindo assim, que o 8-OH-DPAT não atenua os déficits causados pela exposição aos choques incontroláveis quando, a intervenção farmacológica no NMnR é realizada durante a consolidação da memória aversiva.

O conjunto de dados acima, reforça a existência de um circuito temporal essencial para os processos de aquisição, consolidação e evocação de memórias (Izquierdo et al., 2006). Assim, a ausência de efeito do agonista 8-OH-DPAT observada neste estudo pode ser atribuída ao momento que a intervenção farmacológica ocorreu em relação ao evento estressor. Outra explicação para os resultados observados neste estudo, está relacionada com o tipo de agente estressor utilizado. Estudos prévios realizados por Padovan e Guimarães (2004) investigaram a interferência sobre a neurotransmissão glutamatérgica mediada por NMDA no hipocampo em diferentes modelos animais e também em diferentes momentos de intervenção farmacológica. Ao utilizarem o modelo de restrição forçada seguido do teste de Labirinto em Cruz Elevado, verificaram que a atenuação dos efeitos comportamentais, só ocorreu quando o bloqueio de receptores NMDA no hipocampo foi realizado imediatamente após a utilização desse estressor ou vinte e quatro horas depois, imediatamente antes do teste de LCE. Ao seguirem a mesma linha de raciocínio, porém empregando um outro modelo animal, o nado forçado, esses pesquisadores verificaram que as consequências comportamentais da exposição ao agente estressor só foram atenuadas quando o bloqueio de receptores NMDA ocorreu, imediatamente após o evento estressor (Padovan & Guimarães, 2004). Quando utilizado o modelo de desamparo aprendido, também foi observado que a atenuação dos efeitos da exposição a choques elétricos inescapáveis, somente ocorreu quando o AP7 foi administrado no hipocampo antes da pré-exposição, ou imediatamente antes do teste em animais estressados.

De maneira oposta o que é observado na literatura a respeito da intervenção farmacológica com 8-OH-DPAT, estudos com WAY100635 apontam que este fármaco promove a facilitação de formação de memórias ao bloquear a ação inibitória dos receptores 5-HT_{1A} (Ogren et al., 2008). Nesse sentido, era esperado que esse antagonista intensificasse ainda mais os efeitos cognitivos produzidos pela exposição aos eventos incontroláveis. Apesar de nossos resultados não apontarem diferenças estatisticamente significantes em relação aos

tratamentos, os animais que receberam isoladamente este fármaco após os choques incontroláveis, obtiveram uma latência maior e o número superior de animais desamparados em relação ao grupo controle. Assim, mesmo não havendo diferenças significativas, é possível observar uma intensificação desses efeitos comportamentais.

Quanto ao tratamento realizado com antagonista e agonista juntos, nossos resultados demonstram que não houve interação da intervenção farmacológica realizada nos efeitos comportamentais observados após a exposição aos choques incontroláveis. Embora, os animais desampararam em sua totalidade, os resultados não apontam diferenças estatísticas, visto que houve um número expressivo de animais desamparados em todos os grupos de tratamento.

Em se tratando dos animais do grupo controle, que não foram expostos a choques incontroláveis, nossos resultados mostram que os animais pertencentes a essa condição apresentaram baixa porcentagem de animais desamparados. Também apresentaram um número baixo de respostas de falhas e frequência de cruzamentos, esquivas e fugas superiores em relação ao grupo que foi exposto aos choques incontroláveis. Dessa forma, os presentes resultados demonstram que a maioria dos animais aprenderam a resposta de esquiva e/ou fuga quando estes, foram submetidos ao teste e reforçam que a presença de choques inescapáveis dificultam os processos de aprendizagem das respostas de esquiva ou fuga, quando posteriormente esses animais são submetidos a uma condição passível de controle deste evento aversivo (Seligman et al., 1979., Maier & Seligman, 1976).

Ao analisar as intervenções farmacológicas realizadas do grupo controle, verificamos que nenhum tratamento interferiu no desempenho dos animais. O presente resultado foi ao encontro do esperado, visto que esses animais não foram expostos aos choques inescapáveis.

Os resultados do presente trabalho indicam que a exposição de choques incontroláveis 24h antes do teste resulta em déficits cognitivos nos animais quando, estes são expostos

posteriormente a choques escapáveis. Também demonstram que a administração de 8-OH-DPAT intra-NMnR imediatamente antes do teste em animais previamente expostos aos choques incontroláveis não foi capaz de reverter o quadro de desamparo aprendido.

Os resultados sugerem ainda que, nenhum dos tratamentos farmacológicos levou a alterações comportamentais em animais que não foram submetidos aos choques incontroláveis 24 h antes do teste.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a intervenção farmacológica de 8-OH-DPAT intra-NMnR cinco minutos antes da exposição aos choques escapáveis, não foi capaz de atenuar os efeitos causados pela exposição aos choques inescapáveis sugerindo assim, que a ativação do receptor 5-HT_{1A} no NMnR não está envolvida na evocação de memórias aversivas.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Adell, A., Casanovas, J. M., & Artigas, F. (1997). Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*, v. 36, n. 4-5, p. 735-41.
- Adell, A., Carceller, A., & Artigas, F. (1993). In Vivo Brain Dialysis Study of the Somatodendritic Release of Serotonin in the Raphe Nuclei of the Rat: Effects of 8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino)tetralin. *Journal of Neurochemistry*, v. 60, n. 5, p. 1673-1681, maio.
- Almeida, P.V.G., Trovo M.C., Tokumoto A. M., Pereira A. C., & Padovan C.M. (2013). Role of 5-HT_{1A} Receptors in the Median Raphe Nucleus on the behavioural consequences of Forced Swim Stress. *Journal of Psychopharmacology*, v.27 p.1134-1140.
- American Psychiatric Association. (2014). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. 5th. ed. Arlington, VA, EUA: American Psychiatric Publishing.
- Andrade, T. G. C. S., Zangrossi, H. J. R., & Graeff, F. G. (2013). The median raphe nucleus in anxiety revisited. *Journal of Psychopharmacology*, v. 27, n. 12, p. 1107-1115.
- Anisman, H., & Zacharko, R. M. (1992). Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. *Br J Psychiatry*, v.160.
- Avanzi, V., & Brandão M. L. (2001). Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*, v.126, p.175-184.
- Barnes, N. M. & Sharp, T. (1999) .A review of central 5-HT receptores and their function. *Neuropharm*, v.8, p.1083-1152.
- Blier, P. & Montigny, C. (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the ratbrain. *Synapse*, v. 1, p. 470-480,
- Carli, M., Tatarczynska, E., Cervo, L., & Samanin, R. (1993). Stimulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptors causes amnesia and anxiolytic-like but not antidepressant-like effects in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v.234 p. 215-221.
- Del Porto, J. A., Miranda-Scippa, A. M., Quarantini, L. C., & LACERDA, A. L. (2009). *Depressão: do neurônio ao funcionamento social*. Porto Alegre: Artmed.
- Deakin, J.F.W., & Graeff F.G. (1991). 5HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*. v.5, p. 305-315.
- Ferrari, A. J. (2013). et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *PLoS Medicine*, v. 10, n. 11, p. e1001547.
- File, S. E., & Gonzales, L. E., (1996). Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A} receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* v.54, p.123-128,

- File, S. E., Gonzales, L. E., & Andrews, N. (1996). Comparative study of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *Journal of Neuroscience* v.16, p. 4810-4815.
- Greenberg, P. E., Fournier, A. A., Sistsky, T., Pike, C. T., & Kessler, R., C. (2015). The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States. *Journal Clin Psychiatry* v.67, p.155-162,
- Graeff, F. G., Guimarães, F. S., De Andrade, T. G., & Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav.*, 54(1):129-41
- Graeff, F. G., Viana, M. B., & Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. v.21, 791-799.
- Guimarães, F. S. (1999). Medicamentos Antidepressivos e Estabilizadores do Humor. In: Graeff F. G., & Guimarães, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*, 1 ed. cap. 6, p. 93-122.
- Hannon, J. & Hoyer D. (2002). Serotonin receptors and systems: endless diversity? *Acta Biologica Szegediensis*, v.46, p. 1-12.
- Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends in neurosciences*, v.2, p.20, 78-84.
- Hjorth, S., & Sharp, T. (1991) Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life sciences*, v.48 p.1779-1786.
- Hoyer, D., Hannon J.P; Martin G.R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.71 p.533-554,
- Hunziker, M. H. L (2005). O desamparo aprendido revisitado: estudos com animais. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, p.131-139.
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1997). 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.
- Jacobs, B.L., Wise, W.D. & Taylor, K.M. Differential behavioral and neurochemical effects following lesions of the dorsal or median raphe nuclei in rats. *Brain Research*, v.79, p.353-361.
- Joca, S. R. L., Padovan, C. M., & Guimarães, F. S. (2003). Estresse, depressão e hipocampo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25 (Supl II), 46-51.
- Joca, S. R. L., Zanelati, T., & Guimarães, F. S. (2006). Post-stress facilitation of serotonergic, but not noradrenergic, neurotransmission in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development in rats. *Brain research*, 1087(1), 67-74.
- Joca, S. R. L., Zanelati, T. & GUIMARÃES, F. S. (2006) .Post-stress facilitation of serotonergic, but not noradrenergic, neurotransmission in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development in rats. *Brain research*, 1087(1), 67-74.

- Klein, A B. (2010). Brain-Derived neurotrophic factor (BDNF) Interactions with serotonergic systems and its potential as a biomarker in neurological and neuropsychiatric diseases. *Tese (Pós-Doutorado)*- Faculty of Health Sciences. University of Copenhagen, Copenhagen.
- Lowry, C.A., Hale, M.W., Evans, A.K., Heerkens, J., Staub, D.R., Gasser, P.J., Shekhar, A. (2008). Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1148, 2008.
- Joca, S. R. L., Padovan, C. M., Guimarães, F. S. (2003). Estresse, depressão e hipocampo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.25, p.46-51.
- Maier, S.F & Watkins, L.R (1998). Stressor controllability, anxiety, and serotonin. *Cogn Ther Res* v.22 p.595-613.
- Maier, S. F., & Seligman, M. E. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology*: v.105 p.3-46.
- Maier, S.F. (1984) Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* v.8 p.435-444.
- Martin, P., Soubrié, P., & Puech, A. J. (1990). Reversal of helpless behavior by serotonin uptake blockers in rats. *Psychopharmacology*, v.101(3), 403-407.
- Meneses, A., & Hong, E. (2006). Role of 5-HT_{1A} Receptors in Acquisition, *Consolidation and Retrieval of Learning*. *CNS Drug Reviews*, v.3(1), 68-82.
- Murphy, D.L., Andrews, A.M; Wichems. Q.Li, Tohd; Greenberg. Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry* v.59 p.4-12 1998
- Murua, V.S., Gomes., R.A, Andrea M.E., & Molina, V.A. (1991) Shuttle-box deficits induced by chronic variable stress: reversal by imipramine administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, v. 38, p.125-130.
- Nestler, E.J., Barrot, M., Dilleone, R.J., Eish, A.J, Gold, S.J. & Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron.*, v 34, p.13-25.
- Netto, S.M.; Silveira, R., Coimbra, N.C., Joca, S.R., Guimarães, F.S. (2002). Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v26, p.1135-41.
- Ögren, S.O., Eriksson, T.M., Elvander Totti, E., D'addario, C., Ekstrom, J.C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J. & Stiedl, O. (2008). The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behav. Brain Res.* v.195, 54-77.
- O'neil, M. F., & Moore, E.N.A. (2003). Animal models of depression: are there any?. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, v.18, p.239-254.

- Overmeir, J.B & Seligman, M.E. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *J Comp Physiol Psychol* v. 63, p.28-33.
- Padovan, C. M. & Guimarães, F.S. (1993). Attenuation of behavioral consequences of immobilization stress by intrahippocampal microinjection of zimelidine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.26, p.1085-1089.
- Padovan, C. M. & Guimarães, F.S.(2000) Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33 (1):79-83.
- Padovan, C. M. & Guimarães, F.S. (2004). Antidepressant-like effects of NMDA receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, v 77: 15-19
- Paxinos, G.W.C. (2008). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: *Academic Press*.
- Pellow, S. & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, v. 24, n. 3, p. 525–9.
- Porsolt, R.D. (1981). Behavioral despair test. In: Enna SJ e cols.(eds): Antidepressants: Neurochemical, behavioral and clinical perspectives, *Raven Press*, 121-139.
- Post, R.M. (1992) Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *American Journal of Psychiatry*, v. 149, p.999-1010.
- Seligman, M.E.P & Beagley, G. (1975). Learned helplessness in the rat. *Journal of comparative Physiology and Psychology*, v.88, p.534-541.
- Santucci, A.C & Cardillo J. (2004). Memory Reactivation in Rats Treated With the 5-HT_A Agonist 8-OHDP AT: A Case of Gone, but Not Forgotten. *Behavioral Neuroscience*, v.118 248.
- Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v.138.
- Tork, I. (1990) Anatomy of serotonergic system. *Annals of the new York Academy of Sciences*, v.600.
- Vertes, R. P.; Fortin W.J, Crane AM. (1999). Projections of the Median Raphe Nucleus. *J Comp Neurol*, v. 582, p. 555–582,
- Wells, K.B., Stewart, A., Hays, R.D., Burman MA, Rogers W, Daniels M. (1989) The functioning and well-being of depressed patients: results from the medical outcomes study. *Jama*, v.262, p.916-919.
- Willner, P. Animal models of depression: an overview. (1990). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.45, p. 425-455.

Willner, P. Depression, a psychological synthesis. (1985). A *Wiley-Interscience Publication*.
Eds. John Wiley and sons.