

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PPG em NEUROLOGIA – área de concentração em Neurociências

PEDRO GUILHERME PAULETTI LORENZO

Papel dos receptores 5-HT 7 localizados no hipocampo dorsal no desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse de restrição

Ribeirão Preto

2016

PEDRO GUILHERME PAULETTI LORENZO

Papel dos receptores 5-HT 7 localizados no Hipocampo Dorsal no desenvolvimento das consequências comportamentais do Estresse de Restrição

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Neurologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestrado

Área de concentração em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e 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 Faculdade de Medicina
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Lorenzo, Pedro Guilherme Pauletti.

Papel dos receptores 5-HT 7 localizados no Hipocampo Dorsal no desenvolvimento das consequências comportamentais do Estresse de Restrição. Ribeirão Preto 2016.

49p.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2016.

Orientadora Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan.

1. 5-HT 7, 2. hipocampo, 3. estresse, 4. LCE,
5. restrição de movimento,
6. consolidação de memória aversiva

Nome: LORENZO, Pedro Guilherme Pauletti

Título: Papel dos receptores 5-HT 7 localizados no Hipocampo Dorsal no desenvolvimento das consequências comportamentais do Estresse de Restrição

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Neurologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestrado

Área de concentração em Neurociências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À instituição de fomento a pesquisa - CAPES pelos recursos e a oportunidade de desenvolver esse projeto,

À Universidade de São Paulo pelo espaço que me consentiu avançar acadêmica e pessoalmente,

À profa. Dra. Cláudia Maria Padovan pela oportunidade, dedicação e confiança que possibilitaram que eu desenvolvesse esse mestrado,

Aos colegas e amigos de laboratório Adriana, Diego, William, Fabiana, Thalita Thiago Viequetin, Tiago Martins, Priscila e Rodrigo pelo companheirismo, discussões, amizade e risadas, e apoio,

Ao Thiago Vidotto pela amizade, pelo apoio, risadas e vivência em Ribeirão Preto,

E à minha família e amigos de Londrina por sempre me esperarem com um sorriso.

RESUMO

LORENZO, P. G. P. **Papel dos receptores 5-HT 7 localizados no Hipocampo Dorsal no desenvolvimento das consequências comportamentais do Estresse de Restrição.** 2016. 49 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O estresse tem se mostrado como um agravante de diversas patologias e transtornos psiquiátricos, como o transtorno depressivo maior (TDM). Estudos apontam que o hipocampo, bem como as vias serotoninérgicas presentes neste, estão envolvidas com as respostas de estresse bem como nos efeitos deletérios causados por este. O antagonismo do receptor 5-HT 7, presente nestas vias, tem apresentado um efeito antidepressivo e ansiolítico em alguns trabalhos, porém poucos são os estudos que investigam o papel do receptor 5-HT 7 nas estruturas encefálicas em relação às repostas de estresse. Diante desse dado, o presente trabalho utilizou o modelo Labirinto em Cruz Elevado (LCE) 24 horas após a restrição para investigar o papel do receptor 5-HT 7 do hipocampo na consolidação da memória aversiva. A metodologia utilizada consistiu na injeção bilateral de SB-258741, um antagonista do receptor 5-HT7, no hipocampo dorsal de ratos Wistar machos, feita logo após o estresse de restrição de movimento com exposição ao LCE 24 horas depois. Como resultado desta metodologia, foi observado um aumento na porcentagem de entradas dos animais nos braços abertos, mas não na porcentagem de tempo em que o animal permaneceu nestes braços. Este dado mostra que a injeção de um antagonista de 5-HT 7 no hipocampo leva a uma atenuação dos efeitos comportamentais da consolidação de memória aversiva, corroborando com efeito ansiolítico consequente ao antagonismo deste receptor, observado na literatura. Nesse sentido, a investigação sobre o papel desse receptor, nas respostas de estresse, pode ser útil para o desenvolvimento de novos fármacos para os tratamentos dos efeitos prejudiciais do estresse.

Palavras chave: 5-HT 7, hipocampo, estresse, LCE, restrição de movimento, consolidação de memória aversiva

ABSTRACT

LORENZO, P. G. P. **The role of dorsal hippocampus 5-HT7 receptors in the development of Restraint Stress behavioral consequences.** 2016. 49 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Stress has been shown to be an aggravating factor for various diseases and psychiatric disorders, such as major depressive disorder (MDD). Studies suggest that the hippocampus, as well as serotonergic pathways present in this structure, are involved in stress responses as well as in the deleterious effects caused by this factor. The receptor antagonism of 5-HT 7 receptor, present in these pathways, has shown an antidepressant and anxiolytic effect in some studies, but few studies are investigating the role of 5-HT 7 receptor in brain structures related to stress responses. Given this data, this study used the Elevated Plus Maze (EPM) 24 hours after the restraint stress to investigate the role of 5-HT 7 receptor in the hippocampus consolidation of aversive memory. The methodology in this study consisted of bilateral injection of SB-258741, an antagonist of the 5-HT7 receptor, into the dorsal hippocampus of male Wistar rats, made 5 minutes after the restraint stress with exposure to EPM after 24 hours. As a result of this method, an increase in the percentage of animals entries into the open arms, but not at the percentage of time the animal remained in these arms, was observed. This data shows that the injection of a 5-HT 7 antagonist in the hippocampus leads to an attenuation of the aversive memory consolidation behavioral effects, corroborating with the consequent anxiolytic effect to the antagonism of this receptor, presented in the literature. In this sense, research on the role of this receptor in stress responses may be useful for the development of new drugs for the treatment of the harmful effects of stress.

Keywords: 5-HT 7 , hippocampus, stress, LCE , immobilization, aversive memory consolidation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Animais.....	20
3.2 Materiais.....	20
3.2.1 Cirurgia estereotáxica.....	20
3.2.1.1 Equipamentos	20
3.2.1.2 Fármacos	21
3.2.2 Restrição de movimento.....	21
3.2.2.1 Equipamentos	21
3.2.3 Injeção intracerebral.....	21
3.2.3.1 Equipamentos	21
3.2.3.2 Fármacos	22
3.2.4 Teste do LCE	22
3.2.4.1 Equipamentos	22
3.2.5 Perfusão	22
3.2.5.1 Equipamentos	22
3.2.5.2 Fármacos	22
3.3 Procedimento	23
3.3.1 Estudo 1: Curva dose-resposta para determinação das doses de SB-258741	23
3.3.2 Estudo 2: Efeito da injeção bilateral de SB-258741 no hipocampo, 5 minutos após o estresse de restrição, nas consequências comportamentais apresentadas no LCE 24 horas após o estresse	25
3.4 Análise estatística	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Curva Dose-Resposta	27
4.1.1 Frequência de entrada nos Braços Fechados.....	27
4.1.2 Porcentagem de Frequência de Entrada nos Braços Abertos.....	27
4.1.3 Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos.....	27

4.2 Consolidação.....	29
4.2.1 Frequência de Entrada nos Braços Fechados	29
4.2.2 Porcentagem de Frequência nos Braços Abertos	29
4.2.3 Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos.....	29
4.3 Sem estresse	31
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Hans Selye (1936) descreve a Síndrome de Adaptação Geral como uma resposta específica do organismo a estímulos nocivos não específicos. Descreve que essa resposta acontece em três etapas: a resposta de alerta, de resistência e de exaustão (SELYE, 1936) e futuramente atribuiu essa síndrome ao estresse (SELYE, 1955). Além de lesões nos tecidos do organismo, a resposta de estresse também é produzida mediante estressores psicológicos como novidade (HENNESSY et al., 1979; ARMARIO et al., 1985), estímulos neutros pareados com estímulos aversivos (BARRETA, 2005; RAIQ; PHELPS, 2014) e fatores sociais (LAURENT et al., 2016; ARCH; LANDY; 2015).

A condição de estresse pode estar relacionada com patologias de ordem psiquiátrica como transtorno de ansiedade generalizada (SCHOVERS et al., 2003;), depressão maior (TDM) (KENDLER; KARKOWSKY; PRECOTT, 1999), esquizofrenia (PRUESSNER., 2011; CHIAPPELLI et al., 2015) e bipolaridade (DIENES et al., 2006; KIM et al., 2007). Essas patologias podem ser também de ordem infecciosa, uma vez que o estresse está relacionado a um prejuízo do desempenho da atividade do sistema imune (PADGETT ; GALSER, 2003; KEMENY; SCHEDLOWSKI, 2007) e, dessa forma, está relacionado também com o surgimento de câncer (OLIVEIRA et al., 2016; LIU et al., 2015). Porém o estresse, a princípio, não é prejudicial, uma vez que se trata de adaptação do organismo às adversidades do ambiente (SELYE, 1936).

A ativação do eixo HPA é uma das respostas fisiológicas que ocorrem em situações de estresse, e consiste na ativação do hipotálamo, que por sua vez ativa a pituitária e esta ativa as glândulas supra-renais que liberam glicocorticóides (LINDEN et al., 1996; HERMAN, 1997). A liberação de glicocorticóides (GC) pelas supra-renais aumentam as condições do animal em lidar com o estímulo aversivo e são importantes para a consolidação da resposta de estresse (PEETERS, 1994). O estímulo estressor sendo intenso ou contínuo demais pode fazer com que o eixo HPA se torne hiperreativo o que leva a um prejuízo em demais repostas fisiológicas tanto neurais, quanto imunes, digestivas e sexuais (HUETHER et al., 1999). A hiperativação do eixo HPA, responsável por uma das respostas de estresse, está relacionada ao quadro de depressão (VREEBURG et al., 2009).

O termo depressão é usado na linguagem corrente associado a condição de tristeza, normalmente consequente a uma situação de derrota, perda ou desapontamento. Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-V) o transtorno depressivo existe em diversas categorias. Essas categorias são: o transtorno disruptivo da desregulação do humor, transtorno depressivo maior, transtorno depressivo persistente, transtorno depressivo pré-menstrual, transtorno depressivo induzido por substância ou medicamento, transtorno depressivo induzido por condição médica, transtorno depressivo especificado, e transtorno depressivo não especificado. Todas essas categorias caracterizam-se pela presença de humor triste, vazio ou irritável e pelas alterações somáticas ou cognitivas que afetam significativamente a capacidade e funcionamento do indivíduo. O transtorno depressivo maior é a condição clássica desse grupo de transtornos. Apresenta alterações no afeto, cognição, funções neurovegetativas e remissões episódicas. Para que seja considerado um quadro de transtorno depressivo maior, pelo menos cinco sintomas devem ser apresentados, por pelo menos duas semanas. Estes devem causar sofrimento ao indivíduo de forma que atrapalhe o seu funcionamento social, profissional ou outros fatores importantes pra a pessoa. Esses sintomas não devem ocorrer por consequência de medicação, uso de substância ou condição médica. Os sintomas são:

- 1- Humor deprimido
- 2- Diminuição do prazer ou interesse
- 3- Ganho ou perda de peso significativo sem estar fazendo dieta
- 4- Insônia ou hipersônia
- 5- Agitação ou retardo motor
- 6- Fadiga ou perda de energia
- 7- Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva
- 8- Capacidade diminuída de pensar ou manter o foco
- 9- Pensamento de morte, ideação suicida recorrente, tentativa de suicídio

A prevalência do quadro de depressão nos Estados Unidos durante 12 meses é de 7%, sendo que a quantidade de indivíduos com o quadro é 3 vezes maior em indivíduos de 18 a 29 anos do que em indivíduos com mais de 60 anos. Em relação ao gênero, as mulheres tem de 1,5 a 3 vezes mais chances de desenvolver o transtorno depressivo maior que os homens (DSM-V). Segundo o DSM-V, alguns

fatores aumentam a chance do indivíduo desenvolver a depressão, como a afetividade negativa, experiências adversas na infância ou eventos estressantes e fatores genéticos (KENDLER et al., 1997).

A organização mundial de saúde (OMS) prevê que a depressão será a segunda maior questão de saúde pública em 2020 devido a relação com a incapacidade funcional e alta morbi-mortalidade. Estudos apontam que os gastos com esse quadro chegam a 83 bilhões de dólares nos Estados Unidos (DONOHUE; PINCUS, 2007) e 118 bilhões na Europa (SOBOCKI et al., 2006) uma vez que indivíduos depressivos buscam com maior frequência os sistemas de saúde (JOHNSON; WEISSMAN; KLERMAN, 1992). Segundo o estudo de Andrade et al. (2003) a incidência do transtorno é de 3% no Japão, 16,9% nos Estados Unidos. Wiehe et al. (2006) aponta que a depressão acomete 12,6% na cidade de São Paulo, 12,4% em Porto Alegre, e Silva (2012) aponta que o quadro está presente em torno de 11,9% do Distrito Federal.

Corroborando com a ideia de que o quadro depressivo está relacionado a situações de estresse intenso ou crônico, existem diversos estudos em que a respostas de animais frente a estressores intensos, como o teste de esQUIVA passiva, nado forçado, esQUIVA ativa, e estressores crônicos como restrição de movimento, são alteradas por antidepressivos disponíveis para o tratamento em humanos, como fluoxetina, citalopram e desipramina (D'AQUILA et al., 2000; LEÓN; FERNANDEZ; CARDENAS, 2009; PARRA et al., 2010; BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS E SAUDE, 2012; CHUNG et al., 2014; FERNÁNDEZ-GUASTI et al., 2016).

Dentre as estruturas relacionadas às repostas de estresse, o hipocampo tem se mostrado uma estrutura significativa para essa condição fisiológica e comportamental e, portanto, no desenvolvimento do quadro de depressão (MCEWEN, 2000; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). O hipocampo é uma estrutura encefálica relacionada a processos como aprendizado e memória (RIEDEL; MICHEAU, 2001), é uma das estruturas relacionadas ao controle inibitório das repostas de estresse (LATHE, 2001) e também ao processamento de eventos estressores (LOPEZ; AKIL; WATSON, 1999). Este inibe a atividade do eixo HPA quando os seus receptores para GC são ativados, contribuindo para o controle inibitório dessas repostas (HERMAN; CULLINAN, 1997). Além da participação na inibição e processamento das repostas de estresse, o hipocampo também sofre

alterações estruturais significativas relacionadas aos altos níveis de corticosteróides, comuns em situações estressantes, de forma que o feedback negativo que este exerce sobre o eixo HPA é prejudicado. Esse prejuízo na função de feedback negativo do hipocampo mantém os níveis de os hormônios relacionados ao eixo HPA elevados (hormônio liberador de corticotropina, adrenocorticotropina e cortisol), mantendo a condição de estresse no organismo elevada (BROWN; RUSH; MCEWEN, 1999).

No trabalho de Fu et al. (2015) foi demonstrado que a inativação dessa estrutura pelo muscimol, agonista de GABAA, inibiu o freezing apresentado diante do condicionamento de um estímulo luminoso com o choque nas patas. O papel do hipocampo nas repostas de estresse também é descrito no trabalho de Padovan e Guimarães (2004) em que a injeção de AP7, antagonista de NMDA, no hipocampo dorsal, logo após o pré-teste do nado forçado aumentou latência nesse teste. No trabalho de Canto-de-Souza e Mattioli (2016) foi demonstrado que a injeção de animicina (inibidor de síntese proteica) no hipocampo inibe a consolidação de memórias aversivas relacionadas ao choque nas patas. A importância dessa estrutura no desenvolvimento do quadro depressivo também é demonstrada no estudo de Shumake, Edwards e Gonzalez-Lima (2002) em que animais que respondem melhor aos modelos de depressão tem a atividade hipocampal aumentada.

Alguns estudos sobre o hipocampo e as suas vias seronérgicas (BLIER, DE MONTIGNY; CHAPET, 1987, CHEETHAM et al, 1990; DEAKING; GRAEFF, 1991;) levaram muitos farmacêuticos a desenvolverem fármacos que atuam no sistema serotoninérgico para a atenuação dos sintomas de depressão maior (DEN BOER et al., 2000; FRAZER, 1997; VETULANI; NALIPA, 2000). Foi sugerido por Deakin (1983) que projeções do núcleo mediano da rafe para o hipocampo causariam a dissociação de memórias aversivas. Blier, De Montigny e Chapet (1987) reforçam essa idéia sugerindo que antidepressivos aumentam a quantidade de 5-HT 1A no hipocampo com estudos eletrofisiológicos. A partir disso Deaking e Graeff (1991) sugerem que o hipocampo se torna mais responsivo à estimulação do NMR com antidepressivos. Descreveram que as projeções do NMR para o hipocampo estimulariam os receptores 5-HT 1A, mediando as adaptações comportamentais aos eventos aversivos. A exposição a estressores severos leva a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica hipocampal, dessa forma diminui a adaptação ao

estresse crônico, levando ao quadro de depressão em humanos e desamparo aprendido em animais (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Algumas drogas antidepressivas, como as inibidoras de recaptação de serotonina (IRSS), atuam nessas vias aumentando a transmissão serotoninérgica e revertem esse quadro (DEAKIN; GRAEFF, 1991; BLIER, 2003). A zimelidina (IRSS), quando injetada no hipocampo diminui as consequências relacionadas ao estresse da restrição de movimento (GUIMARÃES et al., 1993). No estudo de Joca, Padovan e Guimarães (2003), foi demonstrado que a inibição do desamparo aprendido, causada pela injeção de zimelidina no hipocampo foi atenuada por um antagonista de 5-HT 1A, evidenciando o papel desses receptores no efeito da droga no desamparo aprendido. Corroborando com a ideia de que o quadro depressivo depende do prejuízo de vias serotoninérgicas, Cheetham et al. (1990) demonstrou que amostras do hipocampo de indivíduos que cometeram suicídio tinham uma diminuição na quantidade de 5-HT 1A. Nesse mesmo sentido Deakin et al., (1990) descreve que pacientes deprimidos tem uma diminuição na quantidade de triptofano, precursor da serotonina, enquanto que pacientes recuperados tem um aumento dessa substância na circulação (UPADHYAYA et al, 1991). No trabalho de Kennet, Dickinson e Curson (1985) a repetição ao estresse de restrição levou a atenuação dos efeitos dessa condição aversiva no teste de campo aberto associada ao aumento de 5-HT 1A. Esses efeitos foram alcançados com a injeção de 8-OH-DPAT, agonista de 5-HT 1A logo após um episódio de restrição de movimentos. Kennet, Dourish e Curzom (1987) descrevem que a injeção de 8-OH-DPAT atenuaria os efeitos do estresse de imobilização no campo aberto.

Porém, as IRSS apresentam efeitos colaterais em alguns pacientes ou a falta de resposta aos fármacos que levam ao atraso no tratamento do quadro (HEDLUND et al., 2005; MNIE-FILALI et al., 2011). Alguns fatores levam a esse atraso no efeito antidepressivo da droga, como o período necessário para a dessensibilização dos autorreceptores 5-HT 1A e o consequente aumento da neurotransmissão serotoninérgica do mediano da rafe (BLIER, 2003), e para a estimulação de proliferação celular no giro denteado durante o tratamento farmacológico (SANTARELLI, 2003; CANSTREN, 2004; FAURE, 2006). Os modelos animais apresentam efeitos colaterais indesejáveis para o tratamento do quadro antidepressivo. Hansen (1997) demonstrou que a administração em ratos neonatais aumenta a imobilidade no nado forçado. No estudo de Schulz, Buddenberg e Huston

(2007) a fluoxetina (IRSS) aumentou a imobilidade com a retirada da plataforma no labirinto de água e diminuiu o tempo nos braços abertos e os mergulhos de cabeça no LCE.

No sentido de mostrar alternativas em relação ao tratamento de fluoxetina, o estudo de Minie-Filali (2007) o bloqueio de receptores 5-HT₇ produziram mais rapidamente um efeito antidepressivo no nado forçado, ao mesmo tempo que não leva a respostas ansiogênicas no campo aberto, quando comparado com os efeitos da fluoxetina. Outros estudos sugerem que o antagonismo do receptor 5-HT₇ apresenta efeitos positivos para o tratamento da depressão (MULLINS; GIANUTSOS; EISON, 1999; WESOLOWSKA et al., 2007). No estudo de Mullins, Gianutsos e Eison (1999) o tratamento agudo com antidepressivos e a sua inibição com um antagonista não específico de 5-HT₇ alterou os níveis de c-fos no hipotálamo sugerindo que esse receptor estivesse relacionado com o desenvolvimento de um quadro de depressão. Corroborando com a ideia de que o receptor 5-HT₇ possa contribuir para o tratamento do quadro depressivo alguns trabalhos mostram que este interage com antidepressivos como a mianserina ou a amitriptilina (MONSMA et al., 1993; ELEN et al., 1997). A sensibilidade desse receptor a antidepressivos é apresentada em alguns trabalhos. Abbas A. I. et al (2009) administrou intraperitonealmente amissulprida, um antipsicótico e antidepressivo, em camundongos knockouts para 5-HT₇ que não responderam ao tratamento no teste de nado forçado e no teste de suspensão de cauda comparados aos camundongos controle, evidenciando o papel desses receptores na modulação da resposta de estresse. No trabalho de Sarkisyan, Roberts e Hedlund (2010) camundongos knockouts para 5-HT₇ apresentaram menor imobilidade que os selvagens nos dois testes quando administrados apenas com o veículo. Quando uma dose de citalopram, que não alterava significativamente as respostas do animal, foi administrada com uma dose também inativa de SB-269970, a imobilidade diminuiu no grupo selvagem e não no knockout, demonstrando assim a interferência desse receptor nas respostas ao citalopram. Nesse mesmo sentido, o teste de suspensão de cauda também apresentou diferenças entre o grupo knockout e selvagem. O grupo selvagem diminuiu o tempo em imobilidade apenas quando foi administrado o citalopram + SB-269970. A sensibilidade desse receptor a inibidores de recaptação de noradrenalina também foi demonstrada nesse trabalho. Ao administrar uma dose inativa de desipramina com uma dose inativa de SB-269970 a imobilidade foi

reduzida no grupo de animais selvagens em ambos os testes. A administração de Reboxetina no teste de suspensão de cauda não influenciou nos resultados diferentemente do teste de nado forçado em que diminuiu a imobilidade do grupo selvagem quando administrada com o SB-269970 (ambas em dose inativa).

O receptor 5-HT₇ foi o último receptor serotoninérgico identificado (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004). A ativação desse receptor leva à ativação de uma proteína G que tem por consequência um aumento da conversão do ATP em AMPc pela adenilciclase (KANDEL, 2001). Logo, o 5-HT₇ está relacionado à formação de memória de longo prazo, uma vez que os níveis de AMPc, da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc e o pKA, envolvidos na formação de memória de longo prazo (MANUEL- APOLINAR; MENESES, 2004), são alterados por esse receptor (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004).

O receptor 5-HT₇ é encontrado no sistema nervoso periféricamente (CONTESSE et al., 1999) e no sistema nervoso central em humanos (BARD et al., 1993) assim como em roedores (GUSTAFSON et al., 1996; THOMAS et al., 1999). Gustafson et al., (1996) descreveu que o mRNA para o receptor 5-HT₇ é encontrado principalmente no sistema límbico salientando a amígdala centromedial, hipocampo anterior e hipotálamo em ratos, sugerindo um potencial papel desse receptor nas respostas afetivas. Segundo Neumaier et al. (2001) os receptores 5-HT₇ são encontrados proeminentemente no córtex cerebral, formação hipocampal, tenia tecta, tálamo e hipotálamo em ratos Sprague-Dawley. Por mais que existam algumas diferenças entre o resultado dos dois estudos, ambos concordam com a presença desse receptor no hipocampo.

Diversos trabalhos mostram que o antagonismo do receptor 5-HT₇ leva à atenuação das respostas de estresse. Wesolowska et al. (2006) observou efeito ansiolítico do antagonismo do receptor 5-HT₇ nos testes de labirinto em cruz elevado e no teste de Vogel, resultante da injeção intraperitoneal de SB-269970, um antagonista do 5-HT₇. Neste mesmo trabalho, um efeito antidepressivo, decorrente da injeção do antagonista, também foi observado nos testes de suspensão de cauda e nado forçado. Bonaventure et al. (2007) também conseguiu resultados parecidos no teste de suspensão de cauda, porém, administrando citalopram (inibidor de receptação de serotonina) e SB-269970, injetados um após o outro ou isoladamente. Corroborando com esses resultados o trabalho de Hedlund et al. (2005) obteve como resultado que animais knockout para o gene 5-HT₇ apresentaram menos

tempo em imobilidade no teste de nado forçado e suspensão de cauda que animais controle quando tratados com veículo. Neste trabalho foi demonstrada também a seletividade do fármaco SB-269970, uma vez que esta droga administrada intraperitonealmente reduziu a imobilidade para os animais selvagens, mas não para os knockouts nos dois testes.

A literatura apresenta poucos trabalhos que mostram a influência dos receptores 5-HT₇ do hipocampo nas repostas de memória aversiva. No estudo de Wesolowska, Nikiforuk e Stachowcz (2006), o SB-269970 foi administrado na região CA1 do hipocampo dorsal e obteve resultados equivalentes ao seu outro estudo no teste de conflito de Vogel. No teste de nado forçado os animais tiveram menos tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (WESOLOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWCZ, 2006). A relação desses receptores no hipocampo com o estresse também é apresentada no trabalho de Yau, Noble, e Seckl (2001). Nesse trabalho foi apresentado um aumento (32%) na quantidade de receptores 5-HT₇ nas sub-regiões CA2 e CA3 do hipocampo dorsal e também um aumento significativo na concentração de corticosterona em consequência a exposição a estresse agudo de restrição de movimento.

A exposição ao labirinto em cruz elevado após a restrição de movimento tem sido usado em alguns trabalhos para investigar os efeitos da exposição a um estressor. O LCE é um modelo animal de ansiedade desenvolvido por Montgomery (1955), primeiramente em formato de T, baseado na observação de que o rato tende à se mover próximo a alguma estrutura vertical (tigmotaxia) do que em espaços abertos. A aversividade dos braços abertos foi comprovada por Pellow (1985) ao expor ao labirinto em cruz elevado ratos submetidos a tratamento com drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Os animais submetidos ao tratamento com drogas ansiogênicas permaneceram menos tempo nos braços abertos que o grupo controle, já os ratos submetidos ao tratamento com drogas ansiolíticas permaneceram mais tempo nos braços abertos. Treit (1993) também demonstrou tal aversividade expondo o rato diversas vezes ao labirinto. Com o passar do teste os ratos diminuiram as entradas e o tempo que ficaram nos braços abertos.

Padovan & Guimarães (2000) expuseram ratos à restrição de movimentos por duas horas, e depois os expuseram ao labirinto em cruz elevado 1, 2, 24 e 48 horas depois. Os animais expostos a restrição mostraram alterações significantes em relação ao grupo controle quando expostos ao labirinto 24 e 48h depois do evento

estressor. O trabalho também mostra que os animais se desenvolvem tolerância à restrição de movimentos uma vez que as respostas de ansiedade no labirinto diminuem ao longo de 7 dias de restrição. Corroborando com esse resultado, Belda et al. (2008) também verificou que a restrição de movimento por duas horas leva a consequências comportamentais decorrentes da exposição ao estresse de restrição como a diminuição nas entradas, tempo e distância percorrida nos braços abertos.

Uma vez que o estresse de restrição de movimento leva a consequências comportamentais no LCE resultantes das alterações relacionadas a uma condição de estresse no organismo, e o hipocampo se mostra sensível, bem como também tem um papel na produção dessas respostas, a investigação de como essa relação ocorre surgiu em alguns estudos. Guimarães et al. (1993) reverteu os efeitos ansiogênicos no LCE do estresse de restrição com a injeção intra-hipocampal de zimelidina, inibidor de recaptação de serotonina, e com o 8-OH-DPAT, agonista de 5-HT 1A. Posteriormente, Mendonça Netto e Guimarães (1996) realizaram a injeção, logo após o estresse de restrição, de um agonista não específico de 5-HT (5-McODMT) no hipocampo. Por consequência os efeitos ansiogênicos da restrição de movimento no LCE foram atenuados por esse fármaco. Essa atenuação foi revertida por um antagonista de 5-HT 1A, o WAY100135. No trabalho de Padovan, Del Bel e Guimarães (2000) a injeção de AP7, antagonista de receptor NMDA, no hipocampo, logo depois do estresse de restrição ou logo antes do teste no LCE, aumentou o tempo de exposição do rato aos braços abertos e mostrou uma tendência em aumentar as entradas nesses braços.

Para interferir na atividade dos receptores 5-HT 7 do hipocampo, e nas respostas apresentadas no LCE, conseqüentes à exposição ao estresse de restrição foi utilizado o SB--258741 no presente trabalho. Este é um eficaz e específico antagonista de 5-HT 7 (LOVELL et. al., 2000). Foi demonstrado no estudo de Mahé, C. et al. (2004) que a droga SB-258741 tem uma eficiente atividade como antagonista de 5-HT 7, impossibilitando o aumento de AMPc quando a célula é estimulada por serotonina. A demonstração dessa eficiência foi obtida com a comparação entre o SB-258741, o SB-269970 e outras drogas conhecidas como antagonistas desse receptor como a metiotepina, mesulergina e pimozida. Nesse estudo descreve-se também que o SB-258741 tem baixa atividade como agonista inverso, atingindo apenas 50% dos níveis máximos de inibição de AMPc atingidas pelo SB-269970 e a metiotepina em células não estimuladas por 5-HT.

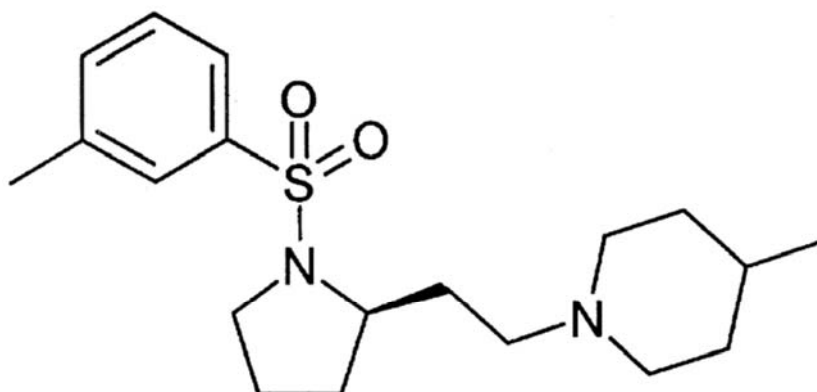


Figura 1 - Estrutura do SB-258741 (POUZET, 2002)

Foram apresentadas diversas relações entre o hipocampo, os receptores 5-HT 7, e fármacos que interferem nas repostas fisiológicas aos eventos estressores. Diante dessas relações, e de alguns problemas quanto a eficácia dos atuais antidepressivos, a continuidade da investigação dos processos neurofisiológicos que envolvem esses campos de conhecimento é imprescindível para o desenvolvimento de novos fármacos com ação cada vez mais específica e eficaz frente aos efeitos deletérios do estresse. Uma vez que diversos estudos apontam que o receptor 5-HT 7 interfere nas repostas frente a estressores, nas repostas a fármacos já utilizados pelo mercado, bem como o hipocampo também tem um papel significativo nesses eventos, a investigação de como esses receptores presentes no hipocampo vão modular essas repostas torna-se necessária para o desenvolvimento de fármacos que atuem sobre esses receptores. Nesse sentido, o trabalho apresentado testa o efeito do antagonista de 5-HT 7, SB-258741, no hipocampo dorsal na consolidação de memória aversiva, consequente a exposição a restrição de movimento. Esses efeitos serão observados no LCE 24h depois do episódio estressor.

Diante da desta literatura, o presente estudo tem como hipótese que a injeção de SB-258741, no hipocampo dorsal, levará à atenuação dos efeitos comportamentais da exposição ao estresse restrição observados no LCE.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel dos receptores 5-HT₇, do hipocampo dorsal, na consolidação de memórias aversivas de ratos Wistar submetidos ao modelo LCE 24 horas após a restrição de movimento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 170 ratos (N=10/tratamento/condição experimental) da linhagem Wistar com aproximadamente sete semanas de idade e com o peso entre 250 e 300g. Os animais foram provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto e foram mantidos no biotério do laboratório aos pares em caixas de acrílico (41 x 34 x 25 cm) forradas com serragem e livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente do biotério é mantida em $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. O biotério é mantido em ciclo claro-escuro de doze em doze horas (início do período claro às 6:30am).

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP – *campus* Ribeirão Preto, tendo recebido certificado sob número 2014.1.231.53.9.

3.2 Materiais

3.2.1 Cirurgia estereotáxica

3.2.1.1 Equipamentos

Aparelhos estereotáxicos (Stoelting); cânulas-guia de aço inox (9mm) com um nó de fio metálico soldado a 4mm de uma das pontas para facilitar a fixação da cânula ao capacete de acrílico; cimento acrílico de uso odontológico para confecção da prótese de fixação da cânula-guia; parafusos em aço inox para auxiliar na fixação do acrílico; mandris de aço inox para impedir o entupimento da luz da cânula-guia e evitar o contato do tecido vivo com o meio externo; instrumentos cirúrgicos (pinça, tesoura, bisturi e espátula); mini-retífica para perfuração óssea (Dremel); secador de cabelos.

3.2.1.2 Fármacos

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 flunixinina meglumina, 5mg/ml (Banamine Injetável; Schering-Plough; 2,5mg/kg, a 1ml/kg de peso corporal; 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) diluída em água destilada.

3.2.2 Restrição de movimento

3.2.2.1 Equipamentos

No procedimento de restrição forçada foram utilizadas gaiolas de aço inox (20 cm x 6,5 cm), com teto removível e ajustável. Para a fixação do teto removível foi usada fita crepe.

3.2.3 Injeção intracerebral

3.2.3.1 Equipamentos

Agulhas gengivais (BD Precision Glide 0,60 x 25 23G1) (10,5mm) para injeção intracerebral; segmentos de polietileno; seringas Hamilton de 10ul; bomba de infusão para administração central (KdScientific).

3.2.3.2 Fármacos

As doses de SB-258741 (1; 3 e 10 nmol/0,5µL), 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 (Montiet al., 2008).

3.2.4 Teste do LCE

3.2.4.1 Equipamentos

Para o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi usado um LCE elevado 50 cm do solo e uma câmera filmadora, acima do LCE que filmou o comportamento dos animais e transmitiu as informações gravadas para um computador para registro das imagens e análise posterior.

3.2.5 Perfusão

3.2.5.1 Equipamentos

Foram usados: tubos de látex com 5mm de espessura para a montagem do sistema de perfusão; agulhas de injeção ligadas ao tubo de látex para injeção das soluções no organismo do animal; bomba peristáltica para a infusão (Sibralab); guilhotina (Bonter Equipamentos) para a retirada da cabeça do animal; instrumentos cirúrgicos.

3.2.5.2 Fármacos

Uretana 25% (Sigma-Aldrich, 1,25g/kg, a 10ml/kg; i.p.) diluída em água destilada como anestésico; solução salina 0,9%; solução de formaldeído a 4%. Para a preparação do material histológico foram usados: aparelho criostato (Leica, modelo Cryocut 1.800) para preparação dos cortes histológicos; lâminas (Precision Glass Line 26,0 x 76,0mm) e lamínulas (Kinttel-Glass); microscópio (Leica, modelo DMX 5500) para análise do sítio de injeção nos cortes histológicos. Todo o material metálico utilizado é inoxidável e foi limpo e desinfetado com álcool 70% antes e depois dos procedimentos.

3.3 Procedimento

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

3.3.1 Estudo 1: Curva dose-resposta para determinação das doses de SB-258741

Objetivo: determinar quais doses de SB-258741 não alteram a atividade exploratória basal dos animais quando submetidos ao teste no labirinto em cruz elevado.

Primeiramente, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de duas cânulas-guia direcionadas ao hipocampo dorsal. Para tanto, foram anestesiados com 2, 2, 2-tribromoetanol a 2,5% (Sigma-Aldrich, 250mg/kg, a 10ml/kg; administrado por via intraperitoneal - i.p.) e depois foi realizada a tricotomia na região da cabeça. Os animais foram fixados no aparelho estereotáxico através do rochedo temporal e incisivos superiores, com a barra dos incisivos -3,3 mm abaixo da linha interaural. Em seguida foi feita a limpeza com álcool iodado da região onde foi realizada a cirurgia e das regiões onde o animal recebeu as injeções. Foram administrados o cloridrato de lidocaína associado a vasoconstritor (Novocol 100; s.c.), o anti-inflamatório, analgésico e antitérmico flunixinina meglumina 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 quatro orifícios no crânio, sendo dois deles para a incisão bilateral das cânulas, através da qual as agulhas foram direcionadas para a injeção intracerebral no hipocampo, de acordo com as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (1997) (ântero-posterior: -4.0 mm; lateralidade: 2.8 mm; profundidade: 2.1 mm; inclinação da haste: 0°). Os outros dois orifícios foram utilizados para a implantação de dois parafusos que auxiliaram na fixação da

prótese de acrílico. Após o término da cirurgia, os animais permaneceram em um ambiente aquecido até retornarem aos seus sentidos. Depois, foram levados ao biotério em suas respectivas caixas para se recuperarem com livre acesso à água e comida.

Sete dias após a cirurgia, os animais foram submetidos ao teste no LCE. Imediatamente antes do teste, os animais receberam uma injeção intracerebral de Salina (0,5µL), ou SB-258741 (1; 3 ou 10 nmol)/,5µL) e dez minutos depois foram testados no LCE.

Os animais foram sempre colocados no aparato com a cabeça voltada para o mesmo braço fechado do LCE e tiveram seus comportamentos registrados durante cinco minutos. Terminado o teste, os ratos foram anestesiados com uretana 25% (i.p.) para a realização da perfusão com solução salina 0,9% e solução de formaldeído 4%. Por fim, os animais foram decapitados com a guilhotina para que pudesse ser realizada a remoção dos encéfalos. Estes foram mantidos em solução de formaldeído para a realização dos cortes histológicos no criostato e montagem de lâminas para verificação no microscópio da localização dos sítios de injeção. Foram considerados apenas os animais cujos sítios de injeção foram confirmados no hipocampo dorsal.

Tabela 1 - Condição experimental e tratamento intracerebral utilizados no estudo 1.

Condição experimental	Tratamento intracerebral
Injeção, sem estresse, 5 minutos antes do teste no LCE	SAL + SAL SB-258741 + SAL (1; 3 e 10 nmoles/0,5µL)

3.3.2 Estudo 2: Efeito da injeção bilateral de SB-258741 no hipocampo, 5 minutos após o estresse de restrição, nas consequências comportamentais apresentadas no LCE 24 horas após o estresse

Objetivo: Investigar se os receptores de tipo 5-HT₇ do hipocampo dorsal estão envolvidos na consolidação da memória aversiva.

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia bilaterais direcionadas ao hipocampo dorsal como descrito no Estudo 1. Após sete dias de recuperação, estes foram submetidos aos testes comportamentais que diferem-se quanto a condição experimental e ao tratamento intracerebral. Na condição experimental referente à aquisição de memória aversiva a injeção intracerebral foi feita 5 minutos antes da restrição, enquanto que na condição experimental referente a consolidação de memória aversiva a injeção intracerebral foi feita 5 minutos depois da restrição. Esta consiste em colocar o rato dentro da gaiola de restrição por duas horas. Na condição sem estresse a injeção foi realizada sem que houvesse a restrição. As condições experimentais e tratamento farmacológico estão esquematizadas na tabela à seguir:

Tabela 2 - Condição experimental e tratamento intracerebral utilizados no estudo dois.

Condição experimental	Tratamento intracerebral
Injeção após o estresse de restrição 24 horas antes do LCE	SAL + SAL
Injeção sem o estresse de restrição 24 horas antes do LCE	SB-258741 + SAL (1 e 3 nmoles/0,5µL)

Terminado o teste, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca como descrito no estudo anterior.

3.4 Análise estatística

Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando-se como fatores o tratamento e a condição experimental (exposição ou não a restrição). Para o estudo da curva dose-resposta foi utilizada ANOVA de uma via. O nível de significância estabelecido é de 0,05. Como post-hoc foi usado o teste de Duncan. Para a comparação entre dois grupos foi usado o teste t.

4 RESULTADOS

4.1 Curva Dose-Resposta

4.1.1 Frequência de entrada nos Braços Fechados

A ANOVA de uma via não apresentou diferenças significantes entre os grupos que receberam as diferentes doses de SB-258741 (1 nmol/0,5µL, 3 nmoles/0,5µL e 10 nmoles/0,5µL) e o grupo salina em relação a frequência de entrada nos braços fechados do LCE ($F_{3,22}=1,585$, $p<0,05$). Isso sugere que a atividade locomotora do animal no LCE não foi alterada significativamente pelas doses fármaco, embora, como apresentado no Gráfico 1, exista uma tendência a diminuição da locomoção do animal para as doses de 1 nmol/0,5µL e 3 nmol/0,5µL.

4.1.2 Porcentagem de Frequência de Entrada nos Braços Abertos

A ANOVA de uma via não apresentou diferenças significantes entre os grupos que receberam as diferentes dosagens de SB-258741 (1 nmol/0,5µL, 3 nmoles/0,5µL e 10 nmoles/0,5µL) e o grupo salina em relação a porcentagem de frequência nos braços abertos do LCE ($F_{3,22}=1,867$, $p<0,05$) (Gráfico 1). Porém o teste de post-hoc de Duncan apontou que o grupo submetido a dosagem de SB-258741 a 1 nmol/0,5µL apresenta uma diferença significativa em relação ao grupo submetido a dosagem 10 nmoles/0,5µL deste fármaco (Gráfico 1).

4.1.3 Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos

A ANOVA de uma via não apresentou diferenças significantes entre os grupos que receberam as diferentes dosagens de SB-258741 (1 nmol/0,5µL, 3 nmoles/0,5µL e 10 nmoles/0,5µL) e o grupo salina em relação a porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ($F_{3,22}= 1,716$, $p<0,05$) (Gráfico 1). Porém, assim como em relação a porcentagem de frequência nos braços abertos, o teste de post-hoc de Duncan apontou que o grupo submetido a dosagem de SB-258741 a 1 nmol/0,5µL apresenta uma diferença significativa em relação ao grupo submetido a dosagem 10 nmoles/0,5µL deste fármaco (Gráfico 1).

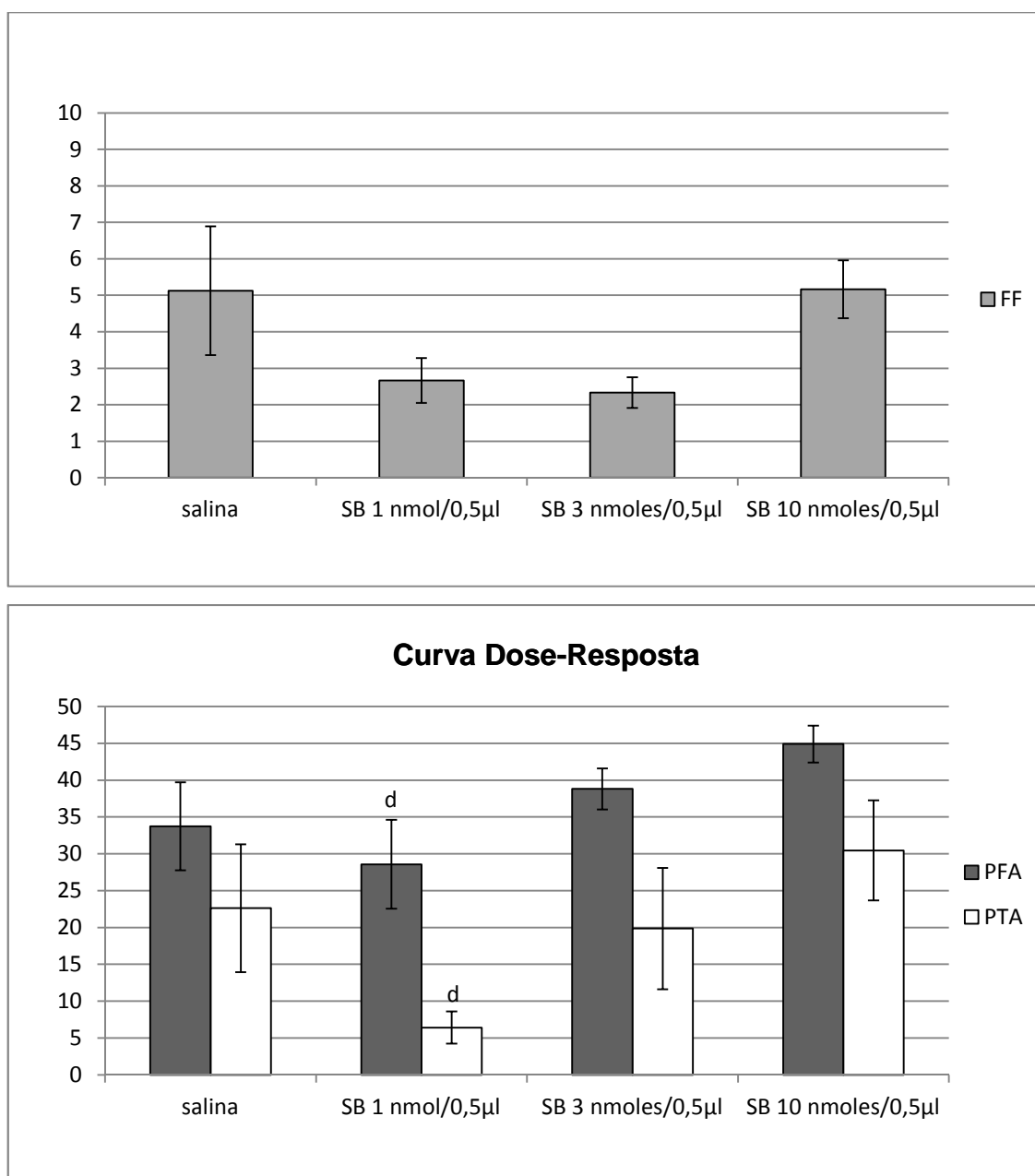


Gráfico 1 - Exploração do LCE na Curva Dose-Resposta

Neste gráfico as barras representam as barras FF representam as médias (\pm E.P.M) da frequência de entrada nos braços fechados (y) do grupo salina (5,13; 0,95 \pm 9,30), SB-258741 a 1 nmol/0,5µL (2,67; 1,09 \pm 4,25), 3 nmoles/0,5µL (2,33; 1,09 \pm 4,25) e 10 nmoles/0,5µL (5,17; 3,13 \pm 7,20), as barras PFA a porcentagem da frequência de entrada nos braços fechados (Y) do grupo salina (33,72; 19,6 \pm 47,84), SB-258741 a 1 nmol/0,5µL (28,57; 13,08 \pm 44,05), 3 nmoles/0,5µL (38,8; 31,64 \pm 45,97) e 10 nmoles/0,5µL (44,89; 38,46 \pm 51,33) e as barras PTA representam a porcentagem de tempo nos braços abertos (Y) do grupo salina (22,61; 2,1 \pm 43,2), SB-258741 a 1 nmol/0,5µL (6,4; 0,82 \pm 12), 3 nmoles/0,5µL (19,86; -1,3 \pm 41,02) e 10 nmoles/0,5µL (30,46; 13,01 \pm 47,9). As linhas no topo de cada barra representam o erro padrão do respectivo grupo. "d" aponta diferença significativa em relação ao grupo submetido ao SB-258741 a 10 nmoles/0,5µL ($p < 0,05$).

4.2 Consolidação

4.2.1 Frequência de Entrada nos Braços Fechados

Assim como na frequência de entrada nos braços fechados da curva dose-resposta, a ANOVA de uma via não apresentou diferenças significantes entre os grupos que receberam as diferentes dosagens de SB-258741 (1 nmol/0,5µL, 3 nmoles/0,5µL) e o grupo salina em relação a frequência de entrada nos braços fechados do LCE ($F_{2,29} = 0,276$, $p < 0,05$) (Gráfico 2). Portanto a atividade locomotora do animal no LCE não foi alterada significativamente pelas doses fármaco.

4.2.2 Porcentagem de Frequência nos Braços Abertos

A ANOVA de uma via apresentou diferenças significantes entre os grupos que receberam as diferentes dosagens de SB-258741 (1 nmol/0,5µL e 3 nmoles/0,5µL) e o grupo salina em relação a porcentagem de frequência nos braços abertos do LCE ($F_{2,29} = 7,9$ $p < 0,05$). Posteriormente o teste de post-hoc de Duncan apontou que o grupo salina e o grupo submetido a dosagem de SB-258741 a 1nmol/0,5µL apresentam uma diferença significativa em relação ao grupo submetido a dosagem 3 nmoles/0,5µL deste fármaco (Gráfico 2).

4.2.3 Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos

A ANOVA de uma via apresentou diferenças significantes entre os grupos que receberam as diferentes dosagens de SB-258741 (1 nmol/0,5µL e 3 nmoles/0,5µL) e o grupo salina em relação a porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ($F_{2,29} = 3,62$, $p < 0,05$) (Gráfico 2). Posteriormente o teste de post-hoc de Duncan apontou que o grupo submetido a dosagem de SB-258741 a 1nmol/0,5µL apresenta uma diferença significativa em relação ao grupo submetido a dosagem 3 nmoles/0,5µL deste fármaco (Gráfico 2).

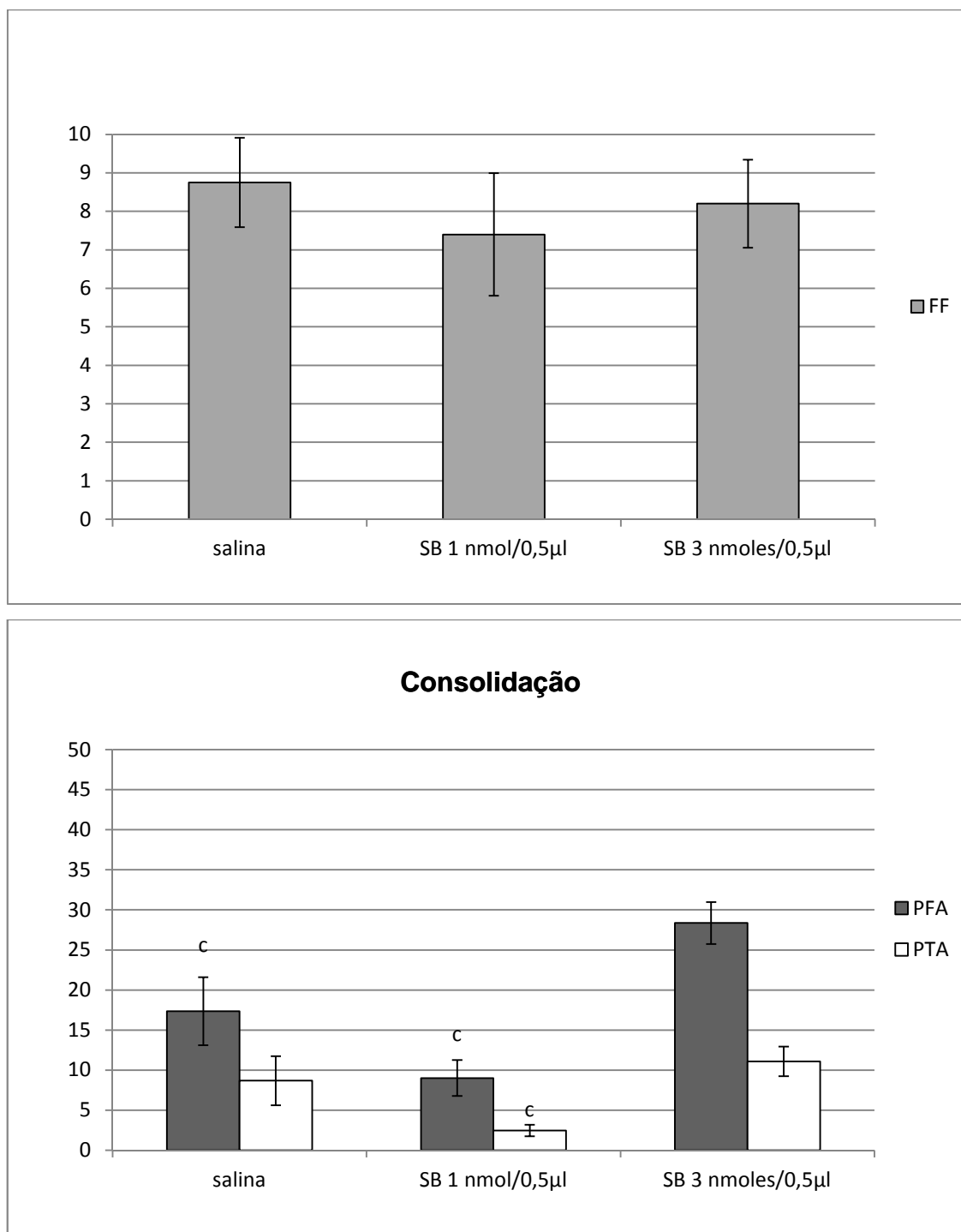


Gráfico 2 - Exploração do LCE na Condição de Consolidação

Neste gráfico as barras **FF** representam as médias (\pm E.P.M) da frequência de entrada nos braços fechados (Y) do grupo salina (8,75; 6,19 \pm 11,31), SB-258741 a 1 nmol/0,5µL (7,4; 3,8 \pm 11) e 3 nmoles/0,5µL (8,2; 5,61 \pm 10,79). As barras **PFA** representam a porcentagem da frequência de entrada nos braços abertos (Y) do grupo salina (17,35; 7,99 \pm 26,72), SB-258741 a 1 nmol/0,5µL (9,0; 3,94 \pm 14,07) e 3 nmoles/0,5µL (28,36; 22,4 \pm 34,29). As barras **PTA** representam a porcentagem da tempo nos braços abertos (Y) do grupo salina (8,68; 1,94 \pm 15,42), SB-258741 a 1 nmol/0,5µL (2,47; 0,83 \pm 4,11) e 3 nmoles/0,5µL (11,08; 6,9 \pm 15,26). "c" representa diferença significativa em relação ao grupo SB-258741 a 3 nmoles/0,5µL e as linhas no topo de cada barra representam o erro padrão do respectivo grupo.

4.3 Sem estresse

O teste-t não encontrou diferenças significantes entre os animais não estressados tratados com salina e com salina + SB-258741 a 3 nmoles/0,5 μ L para a porcentagem de frequência nos braços abertos, porcentagem de tempo nos braços abertos e para a frequência de entradas no braços fechados (Gráfico 3).

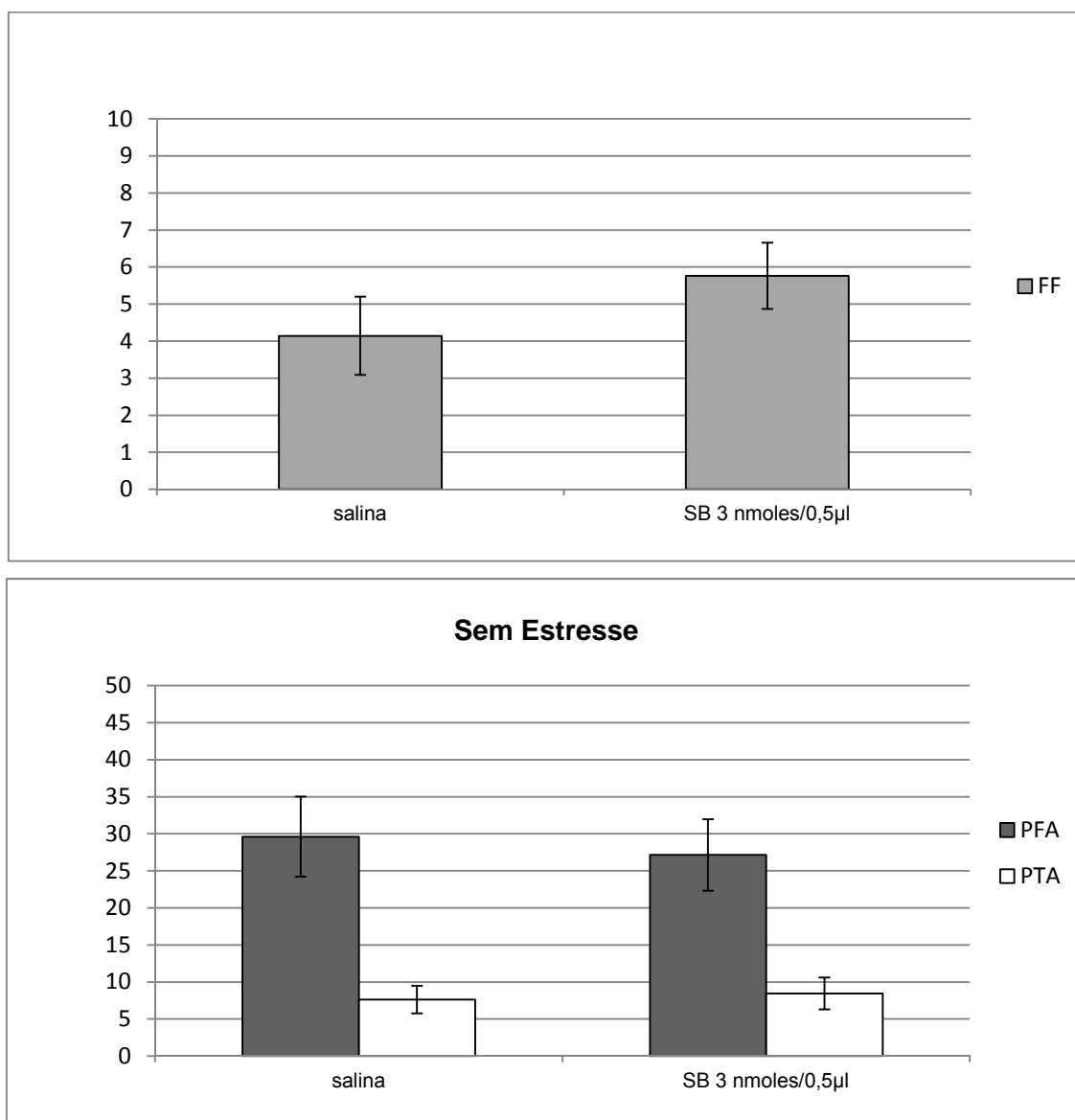


Gráfico 3 - Exploração do LCE na Condição Sem Estresse

Neste gráfico as barras **FF** representam a média (E.P.M. \pm) das frequências de entrada nos braços abertos (Y) do grupo salina (4,14 \pm), SB-258741 a 3 nmoles/0,5 μ L (5,76 \pm), as barras **PFA** representam a porcentagem da frequência de entrada nos braços abertos (Y) do grupo salina (29,6 \pm) e SB-258741 a 3 nmoles/0,5 μ L (27,14 \pm) e as barras **PTA** representam a porcentagem da frequência de entrada nos braços abertos (Y) do grupo salina (7,6 \pm) e SB-258741 a 3 nmoles/0,5 μ L (8,4 \pm). As linhas no topo de cada barra representam o erro padrão do respectivo grupo.

5 DISCUSSÃO

O LCE é um modelo animal que se mostra sensível a mudanças nas condições de estresse (PELLOW et al, 1985). A diminuição da exploração dos braços abertos está relacionada a eventos estressores ou à administração de drogas com efeito ansiogênico, da mesma forma que o aumento da exploração dos braços abertos está relacionada a atenuação da condição de estresse (PELLOW et al, 1985). Diversos trabalhos demonstram que a restrição de movimento é um estressor que altera os resultados em diversos testes comportamentais (PLATT; STONE, 1982; KENNET et al., 1985; WOOD et al., 2008). Os estudos com o LCE e com a restrição de movimento corroboram entre si, uma vez que a literatura aponta que o LCE torna-se sensível às alterações comportamentais do estresse de restrição (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000), enquanto que a administração de fármacos alteram esses resultados (GUIMARÃES et al., 1993, MENDONÇA NETTO; GUIMARÃES, 1996; PADOVAN; DEL BEL; GUIMARÃES 2000).

Diante desses dados, o modelo de exposição ao LCE 24 horas após o estresse de restrição foi utilizado no presente estudo para investigar o papel do receptores 5-HT₇ do hipocampo dorsal nas consequências da exposição a estressores. A literatura aponta que as respostas de estresse, bem como respostas a antidepressivos, envolvem o hipocampo (MENDONÇA NETTO; GUIMARÃES, 1996; MAGARIÑOS; VERDUGO; MCGWEN 1997; MALBERG et al., 2000) e o receptor 5-HT₇ (MULLINS; GIANUTSOS; EISON, 1999; SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2009). Esta também apresenta trabalhos quanto os receptores 5-HT₇ no hipocampo (YAU et al., 1996; YAU; NOBLE; SECKL, 2001; MANUEL-APOLINAR; MENESES, 2004). Porém, são poucos os trabalhos que demonstram o papel do receptor 5-HT₇ no hipocampo em relação as repostas de estresse (WESOLOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ., 2006). Portanto, este estudo torna-se relevante para o conhecimento do substrato neurobiológico do estresse e da depressão e, também, relevante para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no tratamento de transtornos psiquiátricos relacionados a essas repostas, como o TDM (DSM-V).

Neste trabalho as doses de SB-258741 não alteraram a atividade exploratória dos animais em comparação ao grupo salina em nenhum teste, uma vez que não surgiram diferenças significantes entre as comparações feitas quanto à exploração

dos braços fechados. Esse dado garante que as diferenças observadas em relação à exploração dos braços abertos não é relacionada a alguma alteração na atividade motora do animal, e sim a uma alteração na sensibilidade deste quanto à condição aversiva dos braços abertos do LCE (PELLOW et al., 1985). Esse dado corrobora com o estudo de Wesolowska et al. (2006) que administrou SB-269970 intraperitonealmente em camundongos e a atividade locomotora no teste de suspensão de calda não foi alterada. No estudo de Wesolowska, Nikiforuk e Stachowicz (2006) a administração intra-hipocampal, como é feita no presente trabalho, de SB269970 também não alterou a atividade exploratória observada no campo aberto.

Nos testes relacionados à curva dose resposta, apesar não existirem diferenças significantes quanto ao grupo salina em relação a exploração do LCE, as doses de 1 nmol/0,5µL e de 10 nmoles/0,5µL se mostraram menos propícias para a continuidade dos estudos. A dose de 1 nmol/0,5µL apresentou uma tendência a diminuição da atividade locomotora em relação a frequência de entrada nos braços fechados, quando comparada ao grupo salina. Esta dose também apresentou uma tendência ansiogênica ao ser comparada com o grupo salina, em relação a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos. Apresentou também uma diferença significativa em relação a dose de 10 nmoles/0,5µL em relação à essas medidas. Embora seja uma tendência, esse efeito ansiogênico é contrário ao efeito ansiolítico demonstrado na literatura quanto a injeção de um antagonista de 5HT7 no hipocampo (WESOLOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ, 2006). Ainda nesse mesmo teste, dose de 10 nmoles/0,5µL apresentou uma tendência ansiolítica em relação ao grupo salina quanto à porcentagem de frequência e tempo nos braços abertos, que corrobora com a literatura quanto a injeção intra-hipocampal (WESOLOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ, 2006) e intraperitoneal (WESOLOWSKA et al., 2006). A dose de 3 nmoles/0,5µL também apresentou uma tendência à diminuição da atividade locomotora sem apresentar significância em relação ao grupo salina. Porém, diferentemente da dose de 1 nmol/0,5µL e de 10 nmoles/0,5µL, houve uma menor tendência a alguma alteração quanto a exploração dos braços abertos. Esse dado faz com que essa dose seja mais adequada que as outras doses para a continuidade do estudo. É interessante neste estudo que as repostas observadas no LCE sejam minimamente alteradas pela injeção do fármaco quando não há a exposição a um estressor prévio. Esse pré-requisito é necessário

para que no próximo estudo a diferença observada entre o grupo salina e o grupo submetido a uma injeção de SB-258741 deve ocorrer pelo efeito da injeção desse fármaco no hipocampo durante a consolidação e a aquisição de memória aversiva. Portanto, espera-se que o efeito observado não seja influenciado pelo efeito que a dose do fármaco já apresenta isoladamente, sem a variável correspondente a um estressor.

Os resultados desse trabalho mostraram que a diferença entre a injeção intra-hipocampal de salina e a de SB-258741, apareceu somente nos grupos expostos ao estresse de restrição. A diferença entre esses tratamentos, quanto à frequência de entradas nos braços abertos, não apareceu tanto no grupo em que a droga foi injetada 5 minutos antes do teste no LCE, referentes aos testes de curva-dose resposta, assim como também não apareceu nos animais que receberam a injeção 24 horas antes do teste no LCE, referentes ao grupo controle do teste de consolidação. No caso da curva dose resposta o estresse gerado pelo LCE, e pela manipulação do experimentador no animal, não foram suficientes para que o SB-258741 apresentasse um efeito ansiolítico, embora outros fármacos desse grupo apresentem essa característica em alguns estudos (WESOLOWSKA; NIKIFORUK; STACHOWICZ, 2006; WESOLOWSKA et al., 2006), como o SB-269970, lembrando também que uma tendência ao aumento da frequência de entradas nos braços abertos foi observada na dose de 10nmoles/0,5µL. Esse dado aponta que o efeito de agonista inverso do SB-258741, injetado à essa dose no hipocampo, só existe quando o estresse do animal é mais intenso que aquele causado pelo próprio LCE (PELLOW., 1985) e pela manipulação do experimentador (GOUVEIA; HURST, 2013). A literatura aponta o próprio LCE como um estímulo estressor devido ao caráter de novidade deste (MONTGOMERY, 1955, HENNESSY et al., 1978) e pelos braços abertos (MONTGOMERY, 1955; PELLOW et al., 1985), assim como a manipulação do experimentador(GOUVEIA; HURST, 2013).

No teste de consolidação de memória o SB-258741, na dose 3nmoles/05µ, quando injetado no hipocampo dorsal, aumentou a porcentagem de frequência de entradas no braço aberto mas a porcentagem de tempo nesses braços. Este dado confirma a hipótese do estudo de que este fármaco teria um efeito de atenuação das consequências comportamentais do estresse de restrição, quando injetado no hipocampo dorsal. O SB-258741 ao ligar-se com o 5-HT 7, presente nessa estrutura (GUSTAFSON et al., 1996; NEUMAIER et al., 2001), atua como agonista inverso

deste receptor (MAHÉ et al., 2004). Esse receptor quando ativado atua na conversão do ATP em AMPc pela adenilciclase (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004), desencadeamento do processo de consolidação de memória (KANDEL, 2001) no hipocampo (MANUEL-APOLINAR; MENESES, 2004). Segundo o estudo de Mahé et al. (2004), o SB-258741 atua como um agonista inverso de 5-HT_{7r}, o que produz a inibição do aumento de AMPc e, portanto, inibição da consolidação de memória. Alguns estudos apresentam resultados parecidos quanto às consequências da injeção de agonistas inversos de 5-HT₇ em relação às respostas a eventos estressores, mas poucos são os que demonstram essas alterações por consequência da injeção desse fármaco no hipocampo. Como no estudo de Kusek et al. (2015), a atividade hipocampal, que levaria à apresentação de comportamentos relacionados à exposição a um estressor, foi inibida pelo SB-258741. Nesse estudo ele impede a ativação dos receptores de 5-HT₇, presentes na CA1 do hipocampo, com a injeção do SB-269970 nessa região. O estudo de Gill et al., (2002) também mostra que o aumento da atividade da CA3 hipocampal foi inibida pelo SB-269970.

Como neste trabalho, no estudo de Wesolowska, Nikiforuk e Stachowicz (2006) a injeção de SB-269970 no hipocampo também levou a atenuação das consequências a um estímulo estressor, obtendo tanto um efeito antidepressivo quanto um efeito ansiolítico, em ratos. Os animais que receberam a injeção do fármaco no hipocampo apresentaram menor tempo de imobilidade no teste de nado forçado e se tornaram mais tolerantes aos choques no teste de conflito de Vogel.

Alguns estudos, em que a injeção de SB269970 é feita intraperitonealmente, mostram resultados semelhantes aos deste trabalho e ao de Wesolowska, Nikiforuk e Stachowicz (2006). No trabalho de Wesolowska et al. (2007), com camundongos, a injeção de intraperitoneal de SB-269970 também reduziu significativamente a imobilidade no teste de nado forçado, assim como a injeção desse fármaco, em doses que não alteram a resposta do animal ao teste, combinado com imipramina, desipramina e moclobina. No outro trabalho de Wesolowska et al. (2006) a injeção intraperitoneal de SB-269970 também apresentou efeitos antidepressivos e ansiolíticos significantes. Os efeitos ansiolíticos foram observados no teste de conflito de Vogel e no LCE, enquanto que os efeitos antidepressivos foram observados no nado forçado e suspensão de cauda. De forma semelhante como aconteceu no presente trabalho, no trabalho de Wesolowska et al. (2006) a injeção

intraperitoneal de SB-269970 aumentou somente o número de entradas nos braços abertos mas não o tempo que o animal permaneceu nesses braços.

Assim como neste trabalho, outros estudos mostram que a injeção, pós-estresse, de outros fármacos no hipocampo, como zimelidina e 8-OH-DPAT também altera as respostas comportamentais no LCE 24 horas depois da exposição ao estresse de restrição (GUIMARÃES et al. 1993; MENDONÇA-NETTO; GUIMARÃES, 1996). Guimarães et al. (1993) reverteu os efeitos ansiogênicos no LCE do estresse de restrição com a injeção intrahipocampal de zimelidina, inibidor de recapção de serotonina, e com o 8-OH-DPAT, agonista de 5-HT 1A. No trabalho de Netto e Guimarães (1996) a injeção, logo após o estresse de restrição, de um agonista não específico de 5-HT no hipocampo, atenuou os efeitos ansiogênicos da restrição de movimento no LCE enquanto que um antagonista de 5-HT 1A reverteu esse efeito. No trabalho de Padovan, Del Bel e Guimarães (2000) a injeção de AP7, antagonista de receptor NMDA, no hipocampo aumentou o tempo de exposição do rato aos braços abertos e mostrou uma tendência em aumentar as entradas nesses braços. Logo, assim como o antagonismo de receptores NMDA no hipocampo leva a consequências ansiolíticas no LCE, o antagonismo de receptores 5-HT 7 no hipocampo também produz esse efeito.

Esses dados mostram que o papel do hipocampo na consolidação de memória aversiva é modulado por uma interação de diferentes receptores, inclusive o receptor 5-HT 7. O trabalho de Eriksson et al. (2012) mostra uma relação entre os receptores 5-HT 1A e 5-HT 7 em camundongos no teste de esquiva passiva. Nesse trabalho, a facilitação da memória emocional, decorrente do teste de esquiva passiva, foi expressa ao injetar fluoxetina e NAD-299, antagonista dos receptores 5-HT 1A. Esse efeito foi inibido pelo SB-269970, antagonista de 5-HT 7 mostrando o envolvimento desses receptores na memória emocional e a relação inversa que este apresenta com o receptor 5-HT 1A no hipocampo. Tanto o antagonismo de receptores NMDA quanto de receptores 5-HT 7 apresentam efeitos ansiolíticos no LCE 24 horas após o estresse de restrição. O trabalho de Vasefi et al. (2013) mostra que esse efeito ansiolítico, em ambos os casos, pode ocorrer de forma dependente. Nesse trabalho, o aumento das correntes evocadas por picos de NMDA, em neurônios do hipocampo, foi causado por um agonista de 5-HT 7, o 5-CT, enquanto que o SB-269970 impediu esse efeito.

A comparação entre condições, quanto à frequência de entradas nos braços abertos, mostra que os animais submetidos ao estresse de restrição (grupo consolidação) sofreram o efeito da restrição e esse pode ser observado no LCE 24 horas depois, como demonstrado pela literatura (PADOVAN; GUIMARÃES 2000; BELDA et al., 2008;). A exposição do animal aos braços abertos do LCE serve como uma medida dos níveis de estresse produzido pelo organismo submetido ao modelo (PELLOW et al., 1985). Eventos estressantes, ou fármacos de caráter ansiogênico levam a diminuição da exposição do animal aos braços abertos enquanto que fármacos de caráter ansiolítico levam ao aumento (PELLOW et al., 1985). Esse efeito foi apresentado pela diminuição significativa da frequência de entradas nos braços abertos no grupo exposto ao estresse de restrição, como demonstrado nos estudos de Padovan e Guimarães (2000).

Em suma, o presente trabalho demonstrou que a injeção intra-hipocampal SB-258741 altera as consequências comportamentais do estresse de restrição, observadas no LCE 24 horas depois. Esse dado evidencia o papel dos receptores 5-H 7 nessas respostas, uma vez que a literatura aponta a atuação desse fármaco sobre esse receptor (MAHÉ et al., 2004) e a presença desse receptor no hipocampo (NEUMAIER et al., 2001). Dessa forma o presente trabalho torna-se significativo em relação à contribuição para o desenvolvimento de fármacos mais específicos, usados no tratamento do TDM e outros transtornos relacionados ao estresse (DSM-V; BRATS, 2012).

6 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a injeção do SB-258741 no hipocampo dorsal altera as consequências comportamentais do estresse de restrição em relação a consolidação da memória aversiva desse evento. É relevante também o fato de que esse antagonista apresentou resultados que podem ser comparados com o SB-269970. Esse dado pode ser eficaz no desenvolvimento de fármacos mais eficazes e específicos para o tratamento a patologias decorrentes da exposição a estressores, como ansiedade generalizada e depressão maior.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. I. et al. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: Relevance for antidepressant actions in vivo. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 119–128, 2009.
- ARMARIO, A.; MONTERO, J. L.; BALASCH, J. Sensitivity of corticosterone and somemetabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. **Physiology & Behavior**, v. 37, n. D, p. 559–561, 1986.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5**. 5th. ed. Arlington, VA, EUA: American Psychiatric Publishing, 2014.
- ARCK, P. C. et al. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 8, p. 1697–704, 2006.
- ARCH, J. J.; LANDY, L. N.; BROWN, K. W. Predictors and moderators of biopsychological social stress responses following brief self-compassion meditation training. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 35–40, 2016.
- BARD, J. A. et al. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 31, p. 23422–23426, 1993.
- BELDA, X. et al. A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 5, p. 654–661, 2008.
- BERRETTA, S. Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 8, n. 4, p. 221–32, 2005. ity in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 22, n. 5, p. 821–825, 1979.
- BLIER, P.; DE MONTIGNY, C.; CHAPUT, Y. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 7, n. 6 Suppl, p. 24S–35S, dez. 1987.
- BLIER, P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–66, 2003.

BROWN, E. S.; RUSH, A. J.; MCEWEN, B. S. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: Implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 474–484, 1999.

BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS E SAÚDE. Câncer de colo de útero: a vacina para prevenção do hpv e o desafio para a melhoria da qualidade do rastreamento no brasil. **ISSN**, n. 17, 2011.

BONAVENTURE, P. et al. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 321, n. 2, p. 690–698, 2007.

BONAVENTURE, P. 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, 2011.

CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 203–209, 1994.

CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. **NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY**, v. 130, p. 44, 2016.

CASTRÉN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 58–64, 2004.

CIFARIELLO, A.; POMPILI, A.; GASBARRI, A. 5-HT₇ receptors in the modulation of cognitive processes. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 171–179, 2008.

CHEETHAM, S. C. et al. Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides. **Psychopharmacology**, v. 102, n. 4, p. 544–548, dez. 1990.

CHIAPPELLI, J. et al. Disrupted glucocorticoid-Immune interactions during stress response in schizophrenia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 63, p. 86–93, 2016.

CHUNG, S. et al. Desipramine and citalopram attenuate pretest swim-induced increases in prodynorphin immunoreactivity in the dorsal bed nucleus of the stria terminalis and the lateral division of the central nucleus of the amygdala in the forced swimming test. **Neuropeptides**, v. 48, n. 5, p. 273–280, 2014.

CONTESSE, V. et al. Pharmacological and Molecular Characterization of 5-Hydroxytryptamine 7 Receptors in the Rat Adrenal Gland. v. 561, p. 552–561, 1999.

D'AQUILA, P. S. et al. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1, p. 365–373, 2000.

DEAKIN, J. F. Role of serotonergic systems in escape avoidance and other behaviours, **Theory in Psychopharmacology** v.2 p. 149-183, 1983.

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT mechanisms of defence, **Journal of Psychopharmacology**, v.5, n.4, p.305-315, 1991.

DEN BOER, J. A.; BOSKER, F. J.; SLAAP, B. R. Serotonergic drugs in the treatment of depressive and anxiety disorders. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 15, n. 5, p. 315–336, jul. 2000.

EGLIN, R. M. et al. The 5-HT 7 receptor: Orphan found. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 104–107, 1997.

DONOHUE, J. M.; PINCUS, H. A. Reducing the societal burden of depression: a review of economic costs, quality of care and effects of treatment. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n.1 p.7-24. 2007

DIENES, K. A. et al. The stress sensitization hypothesis: Understanding the course of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 95, n. 1-3, p. 43–49, 2006.

ERIKSSON, T. M. et al. 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, n. 6, p. 1150–1160, 2012.

FAURE, C.; MNIE-FILALI, O.; HADDJERI, N. Long-term adaptive changes induced by serotonergic antidepressant drugs. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 6, n. 2, p. 235–45, fev. 2006.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A. et al. Sex and age differences in the antidepressant-like effect of fluoxetine in the forced swim test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2016.

FERRARI, A. J. 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, 2013.

FRAZER, A. Pharmacology of antidepressants. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 17 Suppl 1, p. 2S–18S, abr. 1997.

GILL, C. H. et al. 5-HT 7 receptors modulate synchronized network activity in rat hippocampus. v. 42, p. 82–92, 2002.

GOUVEIA, K. et al. Reducing Mouse Anxiety during Handling: Effect of Experience with Handling Tunnels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66401, 20 jun. 2013.

GUSTAFSON, E. L. et al. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT 7 receptor in rat brain. **British journal of pharmacology**, v. 117, p. 657–666, 1996.

GUIMARÃES, F. S. et al. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1-2, p. 133–9, 20 dez. 1993.

HANSEN, H. H.; SÁNCHEZ, C.; MEIER, E. Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu 10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression? **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1333–41, dez. 1997.

HEDLUND, P. B. et al. 5-HT 7 Receptor Inhibition and Inactivation Induce Antidepressantlike Behavior and Sleep Pattern. p. 831–837, 2005.

HENNESSY, M. B. et al. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 22, n. 5, p. 821–825, 1979.

HERMAN JP, CULLINAN WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Trends Neurosci.**; v.20., p. 78-84. 1997

ISHIBASHI, T. et al. Pharmacological Profile of Lurasidone , a Novel Antipsychotic Receptor Activity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 171–181, 2010.

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

JOHNSON, J., WEISSMAN, M. M., & KLERMAN, G. L.. Service utilization and social morbidity associated with depressive symptoms in the community. **Jama**, v. 267 n.11, 1478-1483, 1992.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KEMENY, M. E.; SCHEDLOWSKI, M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: A stepwise progression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 8, p. 1009–1018, 2007.

KENDLER, K. S.; KARKOWSKI-SHUMAN, L. Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment? **Psychological medicine**, v. 27, n. 3, p. 539–47, 1997.

KENDLER, K. S.; KARKOWSKI, L. M.; PRESCOTT, C. A. Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. **Psychiatry Interpersonal and Biological Processes**, v. 156, n. June, p. 837–841, 1999.

KENNETT, G. A.; DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: The effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. **European Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 3, p. 143–152, dez. 1985.

KENNETT, G. A. et al. Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. **European Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 1, p. 53–60, jun. 1987.

KIM-FUCHS, C. et al. Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: A critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 40, p. 40–47, 2014.

KUSEK, M. et al. Impaired effect of activation of rat hippocampal 5-HT₇ receptors, induced by treatment with the 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 66, n. 2, p. 301–8, abr. 2015.

LAURENT, H. K. et al. Coordination of cortisol response to social evaluative threat with autonomic and inflammatory responses is moderated by stress appraisals and affect. **Biological Psychology**, v. 118, p. 17–24, 2016.

LEÓN, L. A.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CARDENAS, F. P. Effects of chronic intracerebroventricular 3,4-methylenedioxy-N-methamphetamine (MDMA) or fluoxetine on the active avoidance test in rats with or without exposure to mild chronic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 259–264, 2009.

LOVELL P.J. et al. A novel, potent, and selective 5-HT₇ antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-Methylpiperidin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol (SB-269970). **Jornal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 342–345, 2000.

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. 481–486, 2004.

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

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78–84, 1997.

HUETHER, G. et al. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Research**, v. 87, n. 1, p. 83–95, 1999.

LATHE, R. Hormone and hippocampus. **J Endocrinol** v. 31, p.169:205, 2001.

LAURENT, H. K. et al. Coordination of cortisol response to social evaluative threat with autonomic and inflammatory responses is moderated by stress appraisals and affect. **Biological Psychology**, v. 118, p. 17–24, 2016.

LÓPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Neural circuits mediating stress. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 11, p. 1461–1471, 1999.

LINDEN, W. et al. Physiological stress reactivity and recovery: Conceptual siblings separated at birth? **Journal of Psychosomatic Research**, v. 42, n. 2, p. 117–135, 1997.

LUPIEN, S. J. et al. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. **Nature neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 69–73, 1998.

MAGARIÑOS, A. M.; VERDUGO, J. M.; MCEWEN, B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14002–8, 1997.

MAHÉ, C. et al. Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, n. 2-3, p. 97–102, 2004.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9104–9110, 2000.

MANUEL-APOLINAR, L.; MENESES, A. 8-OH-DPAT facilitated memory consolidation and increased hippocampal and cortical cAMP production. **Behavioural Brain Research**, v. 148, n. 1-2, p. 179–184, 2004.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, p. 172–189, 2000.

MENDONÇA NETTO, S.; GUIMARAES, F. S. **Role of hippocampal 5-HT1A receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience** *Behavioural Brain Research*. [s.l: s.n.].

MONSMA, F. J. J. et al. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. **Mol. Pharmacol.**, v. 43, p. 320–327, 1993.

MNIE-FILALI, O. et al. Effects of the serotonin 5-HT 7 receptor antagonist SB-269970 on the inhibition of dopamine neuronal firing induced by amphetamine. v. 570, p. 72–76, 2007.

MNIE-FILALI, O. et al. Pharmacological blockade of 5-HT7 receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1275–88, maio 2011.

MULLINS, U. L.; GIANUTSOS, G.; EISON, A. S. Effects of antidepressants on 5-HT 7 receptor regulation in the rat hypothalamus. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 352–367, 1999.

NEUMAIER, J. F. et al. Localization of 5-HT 7 receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 21, n. 1, p. 63–73, 2001.

NETTO, S. M.; GUIMARÃES, F. Role of hippocampal 5-HT 1A receptors on elevated plus maze exploration after a single restraint experience. **Behavioural brain research**, v. 77, p. 215–218, 1996.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7539–7547, 1995.

OLIVEIRA, B. S. et al. Systematic review of the association between chronic social stress and telomere length: A life course perspective. **Ageing Research Reviews**, v. 26, p. 37–52, 2016.

PADGETT, D. A.; GLASER, R. How stress influences the immune response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 444–448, 2003.

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 Behavior**, v. 67, n. 2, p. 325–330, 2000.

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

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 1, p. 15–19, 2004.

PARRA, A. et al. Effects of co-administration of amitriptyline and fluoxetine on inhibitory avoidance in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 343–348, 2010.

PEETERS, B. W. M. M.; BROEKKAMP, C. L. E. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 4-6, p. 417–427, 1994.

PELLOW, S. et al. 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, n. 3, p. 149–167, 1985.

PHAM, K. et al. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 879–886, 2003.

PLATT, J. E.; STONE, E. A. Chronic restraint stress elicits a positive antidepressant response on the forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v. 82, n. 3-4, p. 179–181, ago. 1982.

PRUESSNER, M. et al. Stress and protective factors in individuals at ultra-high risk for psychosis, first episode psychosis and healthy controls. **Schizophrenia Research**, v. 129, n. 1, p. 29–35, 2011.

RAIO, C. M.; PHELPS, E. A. The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. **Neurobiology of Stress**, v. 1, n. 1, p. 134–146, 2015.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: Desperately seeking resolution. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 835–853, 2001.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5634, p. 805–9, 8 ago. 2003.

SARKISYAN, G.; ROBERTS, A. J.; HEDLUND, P. B. The 5-HT₇ receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 1, p. 99–108, 2010.

SELYE, H. The stress concept in 1955. **Journal of Chronic Diseases**, v. 2, n. 5, p. 583–592, 1955. antidepressant-like behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 1, p. 99–108, 2010.

SOBOCKI, P.; JÖNSSON, B.; ANGST, J.; REHNBERG, C. (2006). Cost of depression in Europe. **The journal of mental health policy and economics**, v. 9(2), 87-98.

SCHOEVERS, R. A. et al. 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, n. 11, p. 994–1001, 2003.

SCHULZ, D. et al. “Despair” induced by extinction trials in the water maze: Relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 3, p. 309–323, mar. 2007.

SHELIN, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H.C. Untreated depression and hippocampal volume loss. **Am J Psychiatry**, v. 160, p. 1516–1518, 2003.

SHUMAKE, J.; EDWARDS, E.; GONZALEZ-LIMA, F. Dissociation of septo-hippocampal metabolism in the congenitally helpless rat. **Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 373–377, 2002.

SPIERINGS, E. L. H.; RANKE, A. H.; HONKOOOP, P. C. Precipitating and aggravating factors of migraine versus tension-type headache. **Headache**, v. 41, n. 6, p. 554–558, 2001.

TANAPAT, P. et al. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. **Journal of Comparative Neurology**, v. 437, n. 4, p. 496–504, 2001.

THOMAS, D. R. et al. 5-CT stimulation of adenylyl cyclase activity in guinea-pig hippocampus: evidence for involvement of 5-HT 7 and 5-HT 1A receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, n. 1, p. 158–164, 1999.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 463–469, 1993.

VASEFI, M. S. et al. Acute 5-HT7 receptor activation increases NMDA-evoked currents and differentially alters NMDA receptor subunit phosphorylation and trafficking in hippocampal neurons. **Molecular brain**, v. 6, p. 24, 2013.

VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 351–363, set. 2000.

VREEBURG, S.A. ; HOOGENDIJK W. J. G. DIAG-, C. I. Major Depressive Disorder and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. v. 66, n. 6, p. 617–626, 2009.

WESOLOWSKA, A. et al. Effect of the selective 5-HT 7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. **Neuropharmacology**, v. 51, p. 578–586, 2006.

WESOLOWSKA, A.; NIKIFORUK, A.; STACHOWICZ, K. Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT 7 receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 553, p. 185–190, 2006.

WESOLOWSKA, A. et al. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT 7 receptor antagonist in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, p. 43–47, 2007. 1.

WIEHE, M. et al. Absence of association between depression and hypertension: results of a prospectively designed population-based study. **Journal of Human Hypertension**, v. 20, n. 6, p. 434–439, 6 jun. 2006.

WOOD, G. E. et al. Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 282–292, 2008.

YAU, J. L. W.; NOBLE, J.; SECKL, J. R. Acute restraint stress increases 5-HT 7 receptor mRNA expression in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 309, n. 3, p. 141–144, 2001.