

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

Papel dos receptores 5-HT_{1A} do Núcleo Mediano da Rafe de ratos nas consequências comportamentais da exposição ao estresse de nado forçado

Alline Mayumi Tokumoto

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

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

*Papel dos receptores 5-HT1A do Núcleo Mediano da Rafe de ratos nas
consequências comportamentais da exposição ao estresse de nado forçado*

Alline Mayumi Tokumoto
Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tokumoto, Alline Mayumi

Papel dos receptores 5-HT_{1A} do Núcleo Mediano da Rafe de ratos nas conseqüências comportamentais da exposição ao estresse de nado forçado. Ribeirão Preto – 2010.

52 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Padovan, Cláudia Maria.

1. Depressão. 2. Receptores 5-HT_{1A}. 3. Estresse de Nado Forçado. 4. 8-OH-DPAT. 5. WAY100635.

Dedico a minha família, que sempre me apoiou.

*Dedico a todos do laboratório, que contribuíram
direta ou indiretamente, para a realização desse
trabalho.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan, por ter me aceito em seu laboratório e pela oportunidade de finalizar mais uma etapa importante de minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão e a todos de seu laboratório que sempre, prontamente, me auxiliaram.

E a todos os professores, especialmente, ao Prof. Dr. Francisco Guimarães e ao Prof. Norberto Coimbra pela atenção e pela oportunidade enriquecedora de aprender dentro e fora das salas de aula.

A Renata Vicentini e ao Igor pelos auxílios administrativos e técnicos prestados.

Aos pós-graduandos de outros laboratórios, pela paciência e dedicação na transmissão dos conhecimentos técnicos, sempre com muito profissionalismo. Agradeço especialmente à Alline, Andressa e Milene.

Aos técnicos e bioteristas Dalmo, João e Thalita que, ao longo desses anos ajudaram muito na rotina diária laboratorial. Agradeço imensamente.

Ao Tadeu pelo ensino das técnicas de coloração de lâminas e pelo auxílio prestado.

Aos amigos do laboratório que me acolheram, Gustavo, Paulo, Diego Henrique, Simone e Selma, e aos amigos que depois vieram, Mayra, Natália, Mariana, Ulisses, Diego Padovan e Kelly. Agradeço pelos ensinamentos, coleguismo, generosidade, apoio e amizade que permearam nossa convivência. Saudades.

Agradeço especialmente à Mayra e ao Diego pela disponibilidade no ensino dos conhecimentos práticos e teóricos sobre o modelo de Nado Forçado, além de todo auxílio prestado durante a realização desse trabalho.

Aos bons e velhos amigos de Botucatu, Eduardo “Nikito”, Rafaela “Ziri”, Agnes e em especial a Melissa “Portera”, pela amizade e companheirismo.

A minha família, por tornar possível a realização de um dos projetos de minha vida, e por todo apoio e incentivo ao longo desses anos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço a Deus por tudo isso.

RESUMO

A exposição a estressores incontroláveis leva a alterações comportamentais e bioquímicas significativas que parecem envolver um mau funcionamento da via serotoninérgica Núcleo Mediano da Rafe (NMnR)-Hipocampo Dorsal, mediada por receptores de tipo 5-HT_{1A} (5-HT_{1A}R), sugerindo que as associações aprendidas, relacionadas à exposição ao estresse e suas conseqüências emocionais, não foram desconectadas. Estudos na literatura sugerem que processos de memória são tempo-dependentes e podem ser alterados pela administração de drogas no momento de sua formação ou evocação. Assim, o objetivo do trabalho foi investigar se a interferência na neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT_{1A}R, no NMnR, em diferentes momentos com relação à exposição ao estresse de nado forçado pode prevenir ou atenuar os efeitos desse estressor. Ratos Wistar machos (n=5-13/grupo) receberam duas injeções intra-NMnR de Salina (Sal), 8-OH-DPAT (DPAT; 3nmoles/0,2µL; agonista 5-HT_{1A}R) e/ou WAY100635 (WAY; 0,3nmoles/0,2µL; antagonista 5-HT_{1A}R) compondo os grupos experimentais: Sal+Sal, Sal+DPAT, WAY+Sal, WAY+DPAT. As drogas foram administradas em três condições experimentais distintas: antes da pré-exposição ao nado forçado; antes do teste em animais submetidos à pré-exposição; ou antes do teste em animais não pré-expostos. O teste ocorreu 24 horas após a pré-exposição. O tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade (LAT) e o tempo total gasto imóvel (IMO) foram registrados. Somente animais com sítios de injeção confirmados foram usados na análise (ANOVA de uma via seguida por teste *post hoc* de Duncan). Nossos resultados sugerem que o tratamento com 8-OH-DPAT antes da pré-exposição ou do teste em animais estressados previne ou atenua, respectivamente, as conseqüências comportamentais da exposição prévia ao estresse de nado forçado. Além disso, nossos dados sugerem que tanto a interferência no processo de aquisição da memória aversiva quanto da evocação da mesma são em parte mediados por 5-HT_{1A}R.

Palavras-chave: Depressão, Receptores 5-HT_{1A}, Estresse de Nado Forçado, 8-OH-DPAT, WAY100635.

ABSTRACT

Exposure to uncontrollable stressors leads to significant behavioral and biochemical changes which has been associated to mal functioning of the Median Raphe Nucleus (NMnR) – Dorsal Hippocampus serotonergic pathway, mediated by receptor type 5-HT1A (5-HT1aR), suggesting that learned associations related to exposure to stress and emotional consequences from such exposure were not disconnected. Published studies suggest that memory processes are time-dependent and can be changed by the administration of drugs at the time of its formation or retrieval. The objective of the present study was to investigate whether interference with serotonergic neurotransmission mediated by 5-HT1aR in NMnR at different times in relation to exposure to forced swim stress could prevent or reduce the effects of this stressor. Male Wistar rats (n = 5-13/grupo) received two intra-NMnR injections of Saline (Sal), 8-OH-DPAT (DPAT; 3nmoles / 0.2 mL; 5-HT1aR agonist) and / or WAY100635 (WAY; 0.3 nmol / 0.2 mL; 5-HT1aR antagonist) composing the experimental groups: Sal + Sal, Sal + DPAT, WAY + Sal, WAY + DPAT. The drugs were administered in three different experimental conditions: before preexposure to forced swim; before testing in animals subjected to preexposure; or before testing in animals not preexposed. The test occurred 24 hours after preexposure. The latency to the first episode of immobility (LAT) and the total time spent immobile (IMO) were registered. Only animals who had their sites of injection confirmed were used in the analysis (one-way ANOVA followed by *post hoc* test Duncan). Our results suggest that treatment with 8-OH-DPAT before preexposure or testing in stressed animals prevents or attenuates, respectively, the behavioral consequences of prior exposure to forced swim stress. Furthermore, our data suggest that both the interference in the acquisition of aversive memory, and the retrieval of the same are partly mediated by 5-HT1aR.

Keywords: Depression, 5-HT1A receptors, Forced Swimming Stress, 8-OH-DPAT, WAY100635.

SUMÁRIO

1	Introdução	08
2	Objetivos	21
3	Materiais e métodos	22
3.1	Animais	22
3.2	Drogas	22
3.3	Equipamento	23
3.4	Procedimento	23
3.4.1	Estudo 1	23
3.4.2	Estudo 2	25
4	Resultados	27
4.1	Estudo 1	28
4.2	Estudo 2	30
5	Discussão	34
6	Conclusões	41
	Referências Bibliográficas	42

1. INTRODUÇÃO

O humor de um indivíduo reflete seu estado emocional. Mudanças de humor ocorrem em resposta a eventos externos e são adaptativas. Porém, quando tais mudanças assumem um caráter inadequado, em termos de intensidade e persistência, alterando de modo constante os estados emocionais e interferindo na rotina do indivíduo, configuram o chamado transtorno de humor (GUMARÃES et al., 2006; KAPLAN et al., 1997).

Conforme o Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM IV), que compreende a nomenclatura oficial e oferece critérios diagnósticos específicos para os transtornos mentais, os transtornos de humor constituem uma categoria diagnóstica que abrange sinais e sintomas clinicamente reconhecíveis, persistentes e geralmente com padrão recorrente ou cíclico. Nele, os transtornos de humor estão divididos em transtornos depressivos, transtornos bipolares e outros transtornos de humor. Há duas manifestações básicas dentro dos transtornos de humor: episódios depressivos - com predomínio de sintomas de tristeza e perda de interesse; e episódios de mania - com predomínio de sintomas de excitação e euforia. Com base no tipo de episódio é feita a classificação. A tabela abaixo apresenta, resumidamente, esta classificação.

Tabela 1 - Classificação dos transtornos de humor de acordo com o DSM-IV

Categoria	Subtipos principais	Características
Transtornos depressivos	Transtorno depressivo maior	Predomínio de humor deprimindo e anedonia, mas sem histórico de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos.
	Transtorno distímico	
	Transtorno depressivo sem outra especificação	
Transtornos bipolares	Transtorno bipolar I	Crises depressivas acompanhadas de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos.
	Transtorno bipolar II	
	Transtorno ciclotímico	
	Transtorno bipolar sem outra especificação	
Outros	Transtorno de humor devido a uma condição médica geral	Perturbação de humor como consequência fisiológica de uma condição médica geral
	Transtorno do humor induzido por substância	Perturbação de humor como consequência fisiológica de uso de droga

(Adaptado do DSM-IV)

Nesse contexto, o termo “depressão” tem sido utilizado para designar uma síndrome cuja principal queixa é o humor deprimido na maior parte do dia. Porém, as manifestações clínicas dos transtornos depressivos receberam outras denominações ao longo dos tempos. O termo depressão era usado para designar sintomas ou estados mentais de uma doença chamada melancolia *–bile negra* (segundo a classificação hipocrática das doenças, baseada nos humores). Como um dos traços que caracterizava a melancolia era tristeza ou abatimento, surgiu a tradução para *de-premere* (pressionar para baixo), a partir da versão latina das obras de Hipócrates. Embora a descrição da depressão remonte aos manuscritos hipocráticos, nosso atual entendimento sobre o transtorno emergiu na segunda metade do século dezanove, com o Tratado de Kraepelin sobre os transtornos psiquiátricos que criou um sistema de classificação das desordens psiquiátricas (SONENREICH et al. 1995; WONG; LICINIO, 2001). Na psiquiatria, o termo depressão é usado para designar entidades nosológicas, como o transtorno depressivo maior ou episódios de transtornos de humor (SONENREICH et al., 1995).

Pelo critério diagnóstico atual, os episódios depressivos maiores (vide Tabela 2) caracterizam o tipo de transtorno depressivo.

Tabela 2 - Critérios diagnósticos do episódio depressivo maior conforme DSM-IV

-
1. Humor deprimido durante a maior parte do dia
 2. Perda marcante do interesse ou prazer em toda ou quase todas as atividades durante a maior parte do dia
 3. Irritabilidade
 4. Perda ou ganho de peso (mudança maior que 5% do peso em um mês) ou diminuição ou aumento do apetite
 5. Insônia ou sono excessivo
 6. Agitação psicomotora ou lentidão dos movimentos
 7. Fadiga ou perda de energia
 8. Sentimento de falta de valor, culpa excessiva ou inapropriada
 9. Redução da capacidade de pensar ou se concentrar, indecisão
 10. Sentimento de falta de esperança
 11. Pensamentos recorrentes de morte, recorrente ideação suicida sem um plano específico, ou tentativa de suicídio ou plano específico para se matar

(Adaptado do DSM-IV)

Para o diagnóstico de episódio depressivo maior, é necessário um período mínimo de duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse, acompanhado por, pelo menos, quatro sintomas adicionais de depressão durante o mesmo período, alterando o estado habitual do indivíduo. Um ou mais episódios depressivos maiores, sem histórico de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos caracterizam o curso clínico da depressão maior. A distímia é caracterizada por, no mínimo, dois anos de humor deprimido acompanhados por sintomas depressivos adicionais, mas sem completar o critério de diagnóstico de depressão maior (DSM-IV).

Os transtornos depressivos são considerados um problema de saúde pública por serem crônicos e incapacitantes, o que demanda um custo de assistência médica, com tempo de trabalho perdido e diminuição da qualidade de vida, sendo responsáveis pela maior parte dos suicídios, com 2/3 deles cometidos por portadores de depressão. Além disso, apresentam alta taxa de comorbidade com outros quadros psiquiátricos e doenças físicas como artrite, hipertensão arterial, diabetes e problemas cardíacos (GREVET; KNIJNIK, 2001; LIMA, 1999). Há indícios de que a incidência de depressão esteja aumentando e se iniciando cada vez mais cedo na população (WONG; LICINIO, 2001). Estudos realizados pela Organização Mundial de Saúde apontam a depressão como uma das mais importantes causas de ameaça à saúde mundial, com perspectivas de agravamento para os próximos anos (DORIS et al., 1999; MURRAY; LOPEZ, 1997).

De acordo com estudos epidemiológicos, a prevalência de transtornos depressivos é alta, independentemente do lugar onde o levantamento foi realizado, do tipo de instrumento diagnóstico usado e dos períodos de tempo para os quais a prevalência se aplica. As mulheres apresentam prevalência de 2:1 em relação aos homens e a idade média do início do curso da doença está entre 20 e 40 anos (GREVET; KNIJNIK, 2001).

Apesar do impacto mundial desse transtorno, a etiologia da depressão não foi completamente elucidada, tendo sua origem relacionada a causas genéticas, ambientais e a fatores que interferem no desenvolvimento cerebral (NESTLER et al., 2002). Em contraste com o limitado conhecimento sobre a depressão estão os numerosos tratamentos disponíveis, dentre eles terapia eletro-convulsiva, psicoterapia e farmacoterapia (DORIS et al., 1999).

Entretanto, a revolução no tratamento da depressão ocorreu na década de 50 com a descoberta casual de duas classes de agentes com propriedades antidepressivas: inibidores da MAO (Monoamina Oxidase – enzima responsável pela degradação intracelular de diversas monoaminas) e antidepressivos tricíclicos. Essas descobertas ocorreram a partir de observações clínicas no tratamento contra a tuberculose, no caso dos inibidores da MAO, e no

uso de anti-histamínicos, no caso dos tricíclicos. As propriedades antidepressivas desses fármacos levaram à elucidação de seu mecanismo agudo de ação. Assim, demonstrou-se que esses fármacos aumentavam as concentrações extracelulares de duas importantes monoaminas no cérebro –serotonina (5-HT) e noradrenalina- pela inibição do catabolismo, no caso dos inibidores da MAO, ou pela inibição da recaptção nos terminais sinápticos, no caso dos tricíclicos (CASTRÉN, 2005; NESTLER et al, 2002; WILLNER, 1990).

Com base no conhecimento do mecanismo agudo de ação dos antidepressivos, mas partindo de evidências distintas, formulou-se a teoria clássica sobre a etiologia da depressão, conhecida como hipótese monoaminérgica, que postula uma deficiência ou desbalanço de 5-HT e noradrenalina no cérebro como causa do transtorno. A primeira tentativa de se explicar a depressão, em termos bioquímicos, ficou conhecida como hipótese noradrenérgica e foi formulada por Joseph Schildkraut e Seimiour Kety, na década de 60. A teoria postula que a depressão é consequência de uma diminuição de atividade noradrenérgica pós-sináptica. Os principais fundamentos dessa teoria foram as evidências farmacológicas da ação dos antidepressivos e a observação clínica de que pacientes tratados com reserpina (alcalóide que depleta estoque de monoaminas nas terminações nervosas) para controle da hipertensão, desenvolviam um quadro semelhante à depressão. Porém, a hipótese não explicava o papel da 5-HT uma vez que, tanto a reserpina quanto inibidores da MAO e tricíclicos afetam os mecanismos serotoninérgicos da mesma forma que os noradrenérgicos (GRAEFF, 1989; GUIMARÃES, 1997).

Posteriormente, Lapin e Oxenkrug propuseram a hipótese serotoninérgica da depressão, em que a depressão é vista como consequência de uma deficiência de 5-HT. As evidências que fundamentaram essa teoria foram, além do mecanismo de ação agudo dos antidepressivos, a observação de que vítimas de suicídios apresentavam baixas concentrações de 5-HT e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), seu principal metabólito. Embora evidenciada a participação desses dois neurotransmissores na etiologia da depressão e nos mecanismos de ação de antidepressivos, os sítios cerebrais envolvidos não foram investigados.

Na década de 80, uma nova geração de antidepressivos foi introduzida com sucesso no tratamento do transtorno: os inibidores seletivos de recaptção de serotonina. Sua ação específica exclui uma inibição significativa de recaptção de noradrenalina (ARTIGAS et al., 2002; BLIER, 2003) reforçando a importância da 5-HT na etiologia da depressão.

Com relação à 5-HT, sabe-se que sua descoberta ocorreu no final dos anos 40, quando Maurice Rapport identificou a substância vasoconstritora encontrada no soro, propriedade que

deu origem a seu nome (GREEN, 2006) e, desde então, tem sido envolvida em estudos sobre a etiologia de transtornos mentais, como depressão e ansiedade, e de funções cognitivas, como aprendizagem e memória. A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano, em duas etapas. Na primeira, o triptofano, é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima triptofano hidroxilase (enzima limitada às células produtoras de 5-HT). Em seguida, o 5-HTP é descarboxilado a 5-HT (5-hidroxitriptamina) pela enzima descarboxilase e estocada em vesículas que são liberadas na fenda sináptica por exocitose. A inativação da 5-HT se deve, principalmente, à recaptação na membrana pré-sináptica por transportadores de 5-HT (SERT) que a transportam da fenda sináptica para o interior do neurônio. Uma vez recaptado, a 5-HT pode ser degradada ou estocada, novamente, em vesículas por ação de transportadores vesiculares de monoamina. A degradação da 5-HT ocorre pela desaminação oxidativa catalisada pela MAO que a converte em 5-hidroxiindol-acetaldeído, seguida de oxidação, pela aldeído desidrogenase, em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Esse metabólito é excretado na urina e serve como indicador da produção de 5-HT no organismo (GREEN, 1978; GRAEFF, 1997; OWENS; NEMEROFF, 1994; RANG et al, 2004).

A anatomia do sistema serotoninérgico central foi descrita em meados dos anos 60. Os neurônios serotoninérgicos são os principais componentes dos chamados núcleos da rafe que constituem a principal fonte de transmissão serotoninérgica cerebral. Esses núcleos estão localizados na linha média do tronco cerebral, com ampla distribuição de fibras no cérebro (AZMITIA, 2001). Os núcleos da rafe seguem uma distribuição rostro-caudal, sendo que os núcleos da rafe caudal incluem o magno, o pálido e o obscuro, todos se projetando em direção à medula espinhal e ao tronco cerebral, constituindo o sistema serotoninérgico descendente. O sistema ascendente compreende os núcleos mais rostrais, que incluem o pontino, o dorsal (NDR) e o mediano da rafe (NMnR), e se projetam em direção a áreas cerebrais de funções superiores (HORNUNG, 2003; ÖGREN et al, 2008).

Quanto aos receptores serotoninérgicos, 14 subtipos foram isolados em mamíferos e classificados em sete grandes famílias, de acordo com critérios farmacológicos e estruturais: 5-HT_{1A/B/D/E/F}, 5-HT_{2A/B/C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A/B}, 5-HT₆ e 5-HT₇ (BARNES; SHARP, 1999). Um dos subtipos mais abundantemente expressados em cérebros de mamíferos é o receptor de tipo 5-HT_{1A} (5-HT_{1aR}), presente no hipocampo (PAZOS; PALACIOS, 1985) e na rafe (CHALMERS; WATSON; 1991). Os 5-HT_{1aR} pré-sinápticos são encontrados no corpo celular e dendritos de neurônios da rafe e os pós-sinápticos, particularmente, no hipocampo. A estimulação do 5-HT_{1aR} hiperpolariza a membrana

neuronal pelo aumento da entrada de K^+ no interior da célula. O receptor 5-HT_{1aR} pré-sináptico age como um auto-receptor inibitório porque sua estimulação resulta na diminuição do disparo neuronal. (BLIER; MONTIGNY, 1994).

A caracterização de novos receptores de 5-HT por técnicas de biologia molecular e de ligante marcado evidenciou a complexidade das neurotransmissões mediadas por 5-HT, demonstrando a simplicidade da teoria monoaminérgica clássica (BLIER, 2003; KALIA, 2005). Consequentemente, novas teorias foram desenvolvidas na tentativa de explicar a etiologia dos transtornos mentais.

Dentre essas teorias, destaca-se a proposta por Deakin e Graeff (1991), que ressalta o papel da 5-HT, considerando a diversidade de receptores para este neurotransmissor em diferentes subsistemas anatômicos.

Esses pesquisadores propuseram que o sistema nervoso central possui diferentes mecanismos de controle sobre a depressão e ansiedade mediados por 5-HT. Esta agiria sobre receptores diversos em estruturas cerebrais distintas, constituindo vias serotoninérgicas funcional e anatomicamente distintas que regulariam a resposta adaptativa a estímulos aversivos inatos ou aprendidos de medo/ansiedade. Assim, projeções do NDR a receptores do tipo 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃ na amígdala e córtex frontal facilitariam o medo condicionado e respostas comportamentais de esquiva e congelamento frente a estímulos ou situações de perigo potencial. Uma disfunção nessa via acarretaria transtornos de ansiedade generalizada. As projeções do NDR a receptores pós-sinápticos do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/2C} da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) constitui a via NDR-periventricular que inibiria reações de luta e fuga em situações de perigo, dor e asfixia. Seu mau funcionamento levaria a transtornos de pânico. Assim, as vias descritas acima regulariam respostas adaptativas ao estresse agudo. As projeções do NMnR a 5-HT_{1aR} do hipocampo dorsal seriam responsáveis pela mediação da adaptação comportamental frente a eventos aversivos crônicos e inescapáveis. Segundo a teoria, isso ocorreria devido à desconexão dos eventos aversivos de suas conseqüências emocionais permitindo que o indivíduo se adapte ou se torne tolerante aos estímulos aversivos crônicos e consiga desempenhar suas atividades normalmente. Uma disfunção dessa via provocaria desamparo aprendido em animais e depressão no homem (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 1993; GRAEFF et al., 1996).

Ainda de acordo com a teoria, a depressão estaria relacionada a uma falha na capacidade de adaptação dos 5-HT_{1aR} na exposição crônica a eventos aversivos e, indiretamente, ao excesso de neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{2A}. Um aumento da neurotransmissão mediada por esse receptor na amígdala e no córtex frontal levaria a

exacerbação da repercussão emocional de estímulos aversivos, efeito oposto ao desempenhado pela neurotransmissão mediada por 5-HT_{1a}R (GRAEFF, 1993).

A teoria de Deakin e Graeff é corroborada por uma série de experimentos realizados por Kennett et al (1985, 1987) sobre o envolvimento do sistema serotoninérgico na adaptação ao estresse repetido. Esses pesquisadores observaram que ratos submetidos a um período de duas horas de restrição e testados vinte e quatro horas depois diminuíram a atividade exploratória no campo aberto, sugerindo que uma experiência estressante prévia é capaz de modificar o comportamento do animal quando submetido a uma nova situação. Porém, esse efeito desapareceu quando os animais foram repetidamente imobilizados durante sete dias consecutivos por um período de duas horas por dia. Num estudo, Kennett et al. (1985), após administração sistêmica de 5-MeO-DMT (5-metoxi-dimetil-triptamina), um agonista serotoninérgico, observaram que o desenvolvimento de tolerância ao estresse, nos animais, também vinha acompanhado de aumento na sensibilidade para a manifestação de sinais da chamada “Síndrome Serotoninérgica”. Esta síndrome inclui sinais como abdução dos membros posteriores, tremores das patas anteriores (“*piano playing*”) e achatamento do corpo, que parecem ser mediados em grande parte por receptores de tipo 5-HT₁. Desse modo, os resultados observados sugerem que a adaptação ao estresse envolve um fortalecimento da neurotransmissão mediada por receptores de tipo 5-HT₁. Essa idéia foi ainda reforçada pela observação de que os efeitos comportamentais do estresse de imobilização foram revertidos pela administração sistêmica (pós-estresse) de 8-hidroxi-2(di-n-amino-propilamina) tetralina (8-OH-DPAT), agonista de 5-HT_{1a}R (KENNETT et al., 1987). Mas, apesar dos achados, os sítios cerebrais envolvidos na mediação desses efeitos não foram estudados.

A utilização de estressores é bastante comum em estudos sobre depressão por induzir alterações comportamentais e neuroquímicas em animais, semelhantes aos sintomas de depressão em humanos (ANISMAN; ZACHARKO, 1992). Estudos em humanos que indicam uma relação entre histórico de episódio depressivo maior e vulnerabilidade a estressores (ILGEN; HUTCHISON, 2005) reforçam a idéia de que o estresse e suas conseqüências estejam envolvidos na etiologia da depressão.

Um dos primeiros pesquisadores a propor uma hipótese relacionando a exposição ao estresse com o aparecimento de quadros depressivos foi Robert M. Post (1992). De acordo com seu estudo, em cerca de 60% dos casos clínicos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes. Além disso, há evidências de que a ocorrência de episódios estressantes é bastante alta nos meses que antecedem os primeiros quadros depressivos. Nesse mesmo estudo, ele sugeriu que a exposição a eventos estressantes

recorrentes, principalmente de origem psicossocial, poderiam aumentar a predisposição do indivíduo à depressão, pois essa exposição levaria a um processo de sensibilização com a ocorrência de crises depressivas cada vez mais intensas, até o momento em que as crises se tornariam espontâneas (POST, 1992). Assim, pode-se dizer que a depressão seja uma resposta mal-adaptativa ao estresse (ANISMAN; ZACHARKO, 1992; McEWEN, 2005).

Desse modo, os efeitos do estresse servem como ferramenta para o desenvolvimento de modelos animais de depressão. Nesses modelos, as alterações fisiológicas e comportamentais observadas em animais de laboratório em resposta a exposição a evento estressante inescapável ou imprevisível são utilizadas no estudo do transtorno (ANISMAN; ZACHARKO, 1992; WILLNER, 1990). Alguns exemplos são o desamparo aprendido (SELIGMAN; BEAGLEY, 1975), o nado forçado (PORSOLT et al., 1977) e a imobilização forçada seguida de teste de campo aberto (KENETT et al., 1985, 1987) ou labirinto em cruz elevado (LCE) (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000a).

Em busca de modelos mais fidedignos, foram estabelecidos critérios de validação considerando a resposta clínica aos antidepressivos, a sintomatologia da depressão e modelos teóricos da depressão. Assim, os modelos animais buscam satisfazer três critérios de validação: o preditivo, o de analogia e o de homologia. A validação preditiva baseia-se na existência de correlação entre os efeitos da droga na situação clínica e no modelo. O critério de analogia verifica a semelhança entre o comportamento do animal no teste e a condição clínica do transtorno. O critério de homologia ou constructo teórico pressupõe a semelhança entre a interpretação teórica do modelo e os conhecimentos sobre a neurobiologia do distúrbio (GUIMARÃES, 1993; WILLNER, 1990). Embora busquem preencher os três critérios, os modelos animais possuem limitações que dificultam esse processo, principalmente se considerarmos os dois últimos critérios, de difícil avaliação empírica. Porém, a maioria dos modelos animais de depressão baseada nas respostas a estressores apresenta validade preditiva (GUIMARÃES et al., 2006).

Dentre eles está o teste do nado forçado proposto por Porsolt et al. (1977). Esse é um teste bastante empregado por apresentar vantagens como facilidade de uso, consonância entre os laboratórios e habilidade em detectar um amplo espectro de agentes antidepressivos, além de apresentar validação para ratos e camundongos (CRYAN et al., 2002) e validade preditiva consistente (GUIMARÃES et al., 2006; WILLNER, 1990).

O teste do nado forçado consiste em colocar o animal num cilindro com água, de modo que ele seja forçado a nadar numa situação em que não há escape. Após várias tentativas de escapar, o animal finalmente cessa o movimento realizando somente o

necessário para manter-se flutuando. Nesse modelo, uma pré-exposição ao nado forçado reduz a latência para a imobilidade e aumenta o tempo de permanência nessa postura durante a maior parte do tempo, no teste subsequente. A imobilidade é interpretada como um estado de “desespero comportamental”, que se assemelharia à sintomatologia da depressão, supondo que o animal desiste de escapar (PORSOLT et al., 1977).

O uso associado de modelos animais com técnicas de biologia molecular tem sido bastante útil na investigação dos substratos neurais relacionados aos transtornos mentais, como nos trabalhos de Guimarães et al. (1993) e Huang et al. (2004). Eles indicam que o hipocampo é ativado em resposta a estressores como restrição forçada e choques inescapáveis, respectivamente, reforçando a proposta dessa estrutura como o local da interação entre 5-HT e adaptação ao estresse. Como mencionado no início, a teoria de Deakin e Graeff (1991) propõe a via NMnR-hipocampo dorsal como responsável pela adaptação ao estresse. Assim, essas duas estruturas cerebrais estão dentre aquelas possivelmente envolvidas na etiologia da depressão.

O hipocampo é uma estrutura bastante rica em 5-HT_{1a}R (PAZOS; PALACIOS, 1985), assim como em receptores de glutamato de tipo NMDA e receptores de glicocorticóides (McEWEN, 2007). Os glicocorticóides (GC) são produzidos na etapa final da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), em resposta ao estresse. A atividade desse eixo é controlada por várias regiões cerebrais, dentre elas, o hipocampo, que exerce influência inibitória sobre ele pela ativação de receptores de GC e influencia o comportamento e a neurotransmissão serotoninérgica (HERMAN; CULLINAN, 1997). Níveis basais de GC, sob condições fisiológicas normais, parecem aumentar a inibição hipocampal sobre o eixo HPA, enquanto níveis elevados e sustentados de GC, em condições prolongadas ou severas de estresse, podem causar danos aos neurônios provocando redução no volume hipocampal (BREMNER et al., 2000), na arborização dendrítica (MARGARIÑOS; McEWEN, 1995) e na neurogênese (GOULD; TANAPAT, 1999). Assim, uma ativação anormal ou excessiva do eixo HPA poderia induzir alterações neuronais que contribuem para o surgimento da depressão (DRANOVSKY; HEN, 2006; NESTLER et al, 2002). Reforçando essa idéia, dados clínicos indicam que uma porcentagem significativa de pacientes que sofrem de depressão maior apresenta alguma forma de ativação do eixo HPA indicadas pelo aumentado nível de cortisol no plasma, na urina e no fluido cerebrospinal (BUDZISZEWSKA, 2002; MANJI, 2001).

Vários estudos indicam que o tratamento com drogas antidepressivas diretamente em estruturas cerebrais específicas, como o hipocampo, é capaz de reverter o quadro de alterações

comportamentais induzidas pela exposição a estressores inescapáveis. Neles, a administração hipocampal de Zimelidina (bloqueador de recaptação de 5-HT) (PADOVAN; GUIMARÃES, 1993), de 8-OH-DPAT (GUIMARÃES et al., 1993) ou 5-MeO-DMT (NETTO; GUIMARÃES, 1996), atenuou o efeito ansiogênico provocado pela exposição à restrição forçada, em ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE). No estudo realizado por Joca et al (2003), a administração de zimelidina também na formação hipocampal reverteu os efeitos da pré-exposição a choques elétricos inescapáveis no modelo do desamparo aprendido. Esses estudos sugerem que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT_{1A}R pós-sinápticos no hipocampo dorsal está envolvida na adaptação ao estresse inescapável, atenuando as conseqüências comportamentais da exposição ao estresse.

Dentre as estruturas anatomicamente ligadas ao hipocampo, o NMnR tem particular importância, pois constitui a principal fonte de inervação serotoninérgica para o hipocampo dorsal (AZMITIA; SEGAL, 1978; VERTES, 1999).

Com relação aos neurotransmissores que participam do funcionamento do NMnR estão o glutamato e o GABA, cujos principais subtipos de receptores encontrados são, respectivamente, NMDA e GABA_A (TAO; AUERBACH, 2003); noradrenalina, por meio de α 1-adrenoceptor e α 2-adrenoceptor (ADELL; ARTIGAS, 1999); além da 5-HT, atuando em 5-HT_{1A}R (CHALMERS; WATSON, 1991). Esse núcleo apresenta grande quantidade de auto-receptores 5-HT_{1A}R que, ao serem ativados, também promovem adaptação dos animais frente a eventos aversivos contínuos (ANDRADE et al., 2001; NETTO et al., 2002). Recentemente, também se registrou a presença de receptores do tipo 5-HT₇ (5-HT_{7R}) no NMnR (DUNCAN et al, 1999).

A importância do NMnR para a adaptação do animal frente a estressores repetidos tem sido demonstrada por vários trabalhos. Neles, os pesquisadores utilizam lesão do NMnR e exposição ao estresse de restrição forçada seguida de teste no LCE (ANDRADE et al., 2001; NETTO et al., 2002). Andrade et al. (2001), utilizando-se desses recursos, mostraram que a lesão de neurônios serotoninérgicos, com a neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), do NMnR promoveu efeito ansiolítico em animais previamente submetidos a um período de duas horas de imobilização e testados vinte e quatro horas depois no LCE, mas não em ratos não estressados.

No estudo conduzido por Netto et al. (2002), observou-se que apenas a lesão de neurônios serotoninérgicos do NMnR não afeta o comportamento dos animais quando testados no LCE, mas o resultado muda se os animais são submetidos ao estresse. Em animais cronicamente estressados, a lesão no NMnR induziu uma diminuição da exploração dos

braços abertos do LCE sem mudar o número de entradas nos braços fechados, indicando um efeito ansiogênico e um prejuízo no desenvolvimento da adaptação ao estresse crônico (NETTO et al, 2002). Tais resultados sugerem que o funcionamento normal da via NMnR-Hipocampo dorsal é imprescindível para a adaptação dos animais frente a eventos estressantes crônicos.

O nado forçado é um estímulo aversivo que interfere no funcionamento normal do sistema serotoninérgico do NMnR. Adell et al. (1997), utilizando o método de microdiálise *in vivo*, demonstraram que a exposição de ratos ao nado forçado por cinco minutos foi capaz de aumentar os níveis de 5-HT no NMnR. No estudo realizado por Briones-Aranda et al (2005) a auto-radiografia indicou diminuição na densidade de 5-HT1aR no NMnR vinte e quatro horas após a exposição de quinze minutos ao nado forçado. Os pesquisadores sugeriram que a liberação transitória de 5-HT, ocorrida durante a apresentação do episódio aversivo, seja responsável pela dessensibilização de 5-HT1aR. Juntos, os resultados sugerem que o estresse de nado forçado pode alterar a neurotransmissão serotoninérgica nessa estrutura, aumentando a concentração de 5-HT durante a apresentação do episódio aversivo, o que diminui a densidade de 5-HT1aR vinte e quatro horas depois.

A partir desses achados, supõe-se que a estimulação de 5-HT1aR no NMnR seja capaz de prevenir o surgimento de alterações comportamentais induzidas pela exposição a estressor incontrollável, como o nado forçado.

Estudos realizados em nosso laboratório confirmam essa suposição (Almeida, Pereira e Padovan, *in prep.*). Observamos que, logo após a pré-exposição ao nado forçado, a administração de 8-OH-DPAT intra-NMnR foi capaz de reverter os déficits comportamentais induzidos pelo estressor. Além disso, observamos que a administração prévia intra-NMnR de WAY100635 (antagonista seletivo de 5-HT1AR) bloqueia os efeitos do 8-OH-DPAT em animais estressados.

Embora os estudos sobre o sistema serotoninérgico do NMnR evidenciem sua participação em situações de exposição a eventos aversivos, os mecanismos envolvidos na mediação das respostas comportamentais necessitam de mais investigações. Sabendo que a ativação de 5-HT1aR no NMR resulta em inibição do disparo neuronal, sugere-se que esse seja o principal mecanismo responsável por desconectar as associações aprendidas envolvidas na exposição a situações estressantes. Como em qualquer processo de aprendizagem e memória – que envolvem aquisição, consolidação e evocação da memória - a associação aprendida em contexto aversivo pode estar sujeita a interferências externas.

Na literatura, muitos estudos indicam que os processos de memória e aprendizagem são tempo-dependentes e estão sujeitos a modificações por drogas no momento de sua formação. McGaugh e Roozeendal (2009) relatam experimentos mostrando que estimulantes do sistema nervoso central (SNC), como estriçnina e picrotoxina, quando administradas antes ou logo após o treino num labirinto, aumentava o desempenho dos animais nos testes de retenção da memória realizados vinte e quatro horas depois. Mas, se a droga fosse administrada muito tempo após o treino, o efeito não era observado.

Há ainda trabalhos indicando que o momento em que ocorre a interferência sobre a neurotransmissão glutamatérgica ou serotoninérgica mediada, respectivamente, por receptores do tipo NMDA e 5-HT_{1a}R, no hipocampo, é determinante nas conseqüências comportamentais desencadeadas pelo estresse (JOCA et al., 2003; PADOVAN; GUIMARÃES, 1993; PADOVAN et al., 2000b; PADOVAN; GUIMARÃES, 2004). Padovan et al. (2000b) realizaram um experimento utilizando estresse por imobilização forçada e teste no LCE com injeção hipocampal de antagonista de receptores do tipo NMDA em diferentes momentos: antes ou após o estresse e antes do teste no LCE. Os resultados sugerem que receptores de tipo NMDA hipocampais estariam envolvidos nas mudanças comportamentais induzidas pelo estresse. Com relação ao NMnR, dados recentes do nosso laboratório mostraram que a ativação de 5-HT_{1a}R (Almeida, Pereira e Padovan, *in prep.*) ou de receptores de tipo NMDA (Pereira, Almeida e Padovan, *in prep.*) logo após o estresse de nado forçado foi capaz de atenuar os déficits comportamentais induzidos por esse estressor no teste subsequente.

Quanto à participação da 5-HT, há várias evidências sobre o papel de diferentes tipos de receptores serotoninérgicos em processos de memória. A 5-HT agiria nos receptores, fortalecendo ou suprimindo a memória, dependendo do momento de sua formação (PEREZ-GARCIA; MENESES, 2008). Revisões sobre o assunto indicam que o subtipo 5-HT_{1a}R é um dos mais estudados. Esse subtipo demonstra afetar os processos de aprendizagem e memória uma vez que a administração de agonistas 5-HT_{1a}R causa prejuízo enquanto antagonistas 5-HT_{1a}R facilitariam tais processos alterando de modo significativo os resultados do teste de retenção para esquiva passiva e medo condicionado em roedores (LUNA-MUNGUÍA et al., 2005; MENESES; PEREZ-GARCIA, 2007; OGREN et al., 2008).

Nesse sentido, os modelos de aprendizagem associativa baseados no condicionamento de medo contextual, como o medo condicionado e a esquiva ativa, são muito utilizados em estudos da memória de experiências emocionais em roedores (OGREN, et al., 2008).

Nessa linha de pesquisa, o estudo realizado por Stiedl et al. (2000) investigou a participação de 5-HT_{1a}R no medo condicionado, em camundongos, variando o momento de administração das drogas, 8-OH-DPAT e WAY100635, e a via de administração - subcutânea ou intra-hipocampal - em relação ao treino. No treino, um estímulo sonoro precedeu a apresentação de um estímulo incondicionado (choque), e a resposta comportamental de medo associada ao contexto ou ao estímulo sonoro foram avaliadas vinte e quatro horas depois, com a exposição do animal ao mesmo contexto do treino e depois a um novo ambiente, respectivamente. Os resultados mostraram que a administração sistêmica de 8-OH-DPAT antes do treino, mas não após, prejudicou a aprendizagem do medo ao contexto indicando envolvimento de 5-HT_{1a}R na aquisição, mas não na consolidação do medo condicionado. Esse prejuízo induzido por 8-OH-DPAT no processo de aquisição do medo condicionado seria resultado da ativação de 5-HT_{1a}R pós-sinápticos hipocampais.

Em outro estudo, Avanzi e Brandão (2001) usando um paradigma de condicionamento de medo contextual investigaram se as respostas autonômicas e de congelamento ao contexto previamente pareado a choque inescapável eram afetadas por injeções intra-NMnR com NMDA ou 8-OH-DPAT, antes do treino. Os resultados mostraram que tanto NMDA quanto 8-OH-DPAT intra-NMnR foram capazes de inibir completamente o comportamento de congelamento nos animais. Os resultados indicam o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos durante o processo de formação de memória do medo condicionado associado a contexto aversivo.

Juntos, esses estudos reforçam as evidências de que a via NMnR-hipocampo esteja envolvida na formação da memória aversiva e nos mecanismos de resistência ao estresse.

Em conjunto, os trabalhos demonstram que, dependendo do momento e da estrutura cerebral em que a intervenção farmacológica ocorre, os processos de memória podem ser alterados. Então, sugerimos que a memória aversiva relacionada ao estresse de nado forçado também possa sofrer alterações durante seu processo de formação ou evocação, pela interferência na neurotransmissão serotoninérgica no NMnR.

Assim, a hipótese do trabalho é de que os 5-HT_{1a}R do NMnR participam dos processos de aquisição e/ou expressão das memórias aversivas relacionadas ao estresse de nado forçado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Investigar se a interferência na neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT1aR, no NMnR, em diferentes momentos com relação à exposição a um estressor incontrolável, pode prevenir ou atenuar as consequências comportamentais resultantes da exposição ao estressor.

2.2 Objetivos específicos:

1. Investigar a participação de receptores de tipo 5-HT1A na aquisição de memórias aversivas relacionadas ao estresse de nado forçado.
2. Investigar a participação de receptores de tipo 5-HT1A na expressão de memórias aversivas relacionadas ao estresse de nado forçado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 89 ratos Wistar machos (n=5-13 ratos/grupo), com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em grupos de quatro no biotério do laboratório, que apresenta temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de luz (claro/escuro 12h x 12h - início do período claro às 7:00 h) controlados, com livre acesso à água e comida, até completarem sete semanas de idade. Em seguida foram mantidos aos pares em caixas de acrílico (35x19x25cm) forradas com serragem, sendo em seguida submetidos à cirurgia estereotáxica como descrito a seguir.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto (**processo CEUA número 01.1.169.53.3**).

3.2 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas:

- WAY100635 (Sigma; 0,3 nmol/0,2 μl) antagonista seletivo para receptores 5-HT_{1A} (DOS SANTOS et al., 2005; SANBERG et al., 2006);
- 8-OH-DPAT (Sigma; 3 nmol/0,2 μl) agonista seletivo para receptores 5-HT_{1A}; (DOS SANTOS et al., 2005; SANBERG et al., 2006);
- 2,2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich; 2,5%, 10mL/Kg, i.p.) – anestésico utilizado para o procedimento de cirurgia estereotáxica para implantação da cânula-guia;
- Cloridrato de Lidocaína associado a um vasoconstritor (1:50.000, Novocol 100, S.S. White-Brasil, 200 μL) – anestésico local;
- Pentabiótico (Fontoura-Wyeth-Brasil; 0,2mL/animal, via intramuscular) – antibiótico;
- Banamine (10%, 1mL/Kg de peso, via subcutânea) – analgésico e anti-inflamatório;

- Uretana (Sigma-Aldrich; 25%, 5mL/Kg, i.p.) – anestésico utilizado para o procedimento de perfusão.

3.3 Equipamentos:

- Cânulas, parafusos e mandris de aço inoxidável;
- Aparelho estereotáxico (Stoelting);
- Seringas Hamilton de 10 μ L; agulhas odontológicas para injeção central; segmentos de polietileno (PE 10);
- Bomba de infusão (Insight).
- Recipiente para nado forçado: tanque cilíndrico de acrílico transparente com 35 cm de diâmetro e 65 cm de altura, com água a uma altura de 30 cm. A temperatura da água foi de 25 \pm 1°C.
- Câmera de filmagem; aparelho de DVD e computador.

3.4 Procedimentos

Todos os estudos foram realizados entre 9:00-12:00h e encontram-se detalhados a seguir.

3.4.1 Estudo 1: Efeitos do tratamento intra-NMnR com 8-OH-DPAT e/ou WAY100635 administrados previamente ao estresse sobre o comportamento de ratos no teste do Nado Forçado (Inj+NF-T)

Objetivo: investigar os participação de receptores de tipo 5-HT1A na aquisição de memórias aversivas relacionadas ao estresse de nado forçado.

Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente (i.p.) com 2, 2, 2 tribromoetanol (2,5 g/100 ml, 10 ml/kg, Aldrich, EUA) e submetido à tricotomia na região da cabeça. Em seguida, o animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) pelo rochedo temporal e incisivos superiores, com a barra dos incisivos a -3,3 mm abaixo da linha interaural. A limpeza do campo cirúrgico foi realizada com uma solução hidroalcoólica de iodo a 2%. Na região da incisão foi administrado, por via subcutânea, o anestésico local

cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (1:50.000, Novocol 100, S.S. White-Brasil, 200 μ L). Após indução anestésica, uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil) foi administrada (0,2mL/animal, via intramuscular) a fim de prevenir possíveis infecções, assim como o analgésico e anti-inflamatório Banamine (10%, 1mL/Kg de peso, via subcutânea).

Em seguida, uma incisão longitudinal foi realizada, expondo-se o crânio e o periósteo foi removido por raspagem. Após esses procedimentos, dois orifícios foram abertos para a fixação de parafusos que auxiliaram na fixação da prótese de acrílico 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) no NMnR (ântero-posterior: -7,3; lateral: 2,7; profundidade: -7,8; inclinação da haste: 18°). A fim de se evitar lesões na área de interesse, a cânula-guia permaneceu 1,5mm acima do NMnR, diferença corrigida no momento da administração da droga, utilizando-se uma agulha cujo comprimento total é de 15,5mm. Após a implantação e fixação da cânula com acrílico auto-polimerisável, um mandril de aço inoxidável foi introduzido em seu interior para evitar entupimento, sendo também fixado com acrílico.

Depois da cirurgia, os animais permaneceram aos pares em caixas de acrílico se recuperando no biotério por um período de 5 a 7 dias quando, então, foram submetidos aos procedimentos experimentais.

Passado o período de recuperação, os animais receberam duas injeções intra-NMnR de Salina, WAY 100635 e/ou 8-OH-DPAT em associação, conforme descrito na Tabela 3. O intervalo entre a primeira e a segunda injeção foi de cinco minutos, assim como o intervalo entre a segunda injeção e a pré-exposição ao nado. As injeções foram realizadas com o auxílio de uma bomba de infusão, com velocidade controlada de 0,4 μ l por minuto. Após o término da injeção, a agulha permaneceu no sítio de injeção por mais 1 minuto, para evitar refluxo da droga.

Tabela 3 - Grupos experimentais e tratamento intracerebral

1ª Injeção	2ª Injeção
Salina	Salina
Salina	8-OH-DPAT
WAY100635	Salina
WAY100635	8-OH-DPAT

Imediatamente após o término dos tratamentos intracerebrais, os animais foram colocados no tanque de acrílico com água durante 15 minutos. Em seguida, foram retirados da água, secos com toalha e levados de volta às gaiolas no biotério, sem qualquer manipulação até a realização do teste, no dia seguinte.

Na sessão teste, os animais foram recolocados no tanque com água por 5 minutos e tiveram seus comportamentos registrados. A latência para o aparecimento do primeiro episódio de imobilidade (LAT), assim como o tempo total que o animal permaneceu imóvel (IMO) na água, fazendo apenas pequenos movimentos para se manter flutuando, foram analisados.

3.4.2 Estudo 2: Efeitos do tratamento intra-NMnR com 8-OH-DPAT e/ou WAY100635 administrados imediatamente antes do teste sobre o comportamento de ratos previamente expostos (NF-Inj+T) ou não (Inj+T) ao estresse de Nado Forçado.

Objetivo: investigar a participação de receptores de tipo 5-HT1A na expressão de memórias aversivas relacionadas ao estresse de nado forçado.

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia direcionada para o NMnR como descrito anteriormente. Passado o período de recuperação, os animais foram expostos ao estresse de nado forçado durante 15 minutos (vide estudo 1). Vinte e quatro horas depois, receberam duas injeções intracerebrais de Salina, WAY100635 e/ou 8-OH-DPAT em associação. Cinco minutos após o término da segunda injeção, os animais foram testados, registrando-se o LAT e o IMO. O grupo controle dessa condição experimental recebeu os tratamentos intracerebrais antes do teste, sem, no entanto, ter sido previamente exposto ao nado forçado.

Perfusão

Após o término do teste, os animais foram anestesiados com uretana a 25% (5mL/Kg, i.p.) e submetidos à perfusão intracardíaca com salina seguida de formol a 10%. Os cérebros foram removidos e armazenados em formol a 10% até a data dos cortes histológicos e confecção das lâminas histológicas.

Histologia

Os cérebros foram cortados em secções coronais de 50 μ m de espessura utilizando-se um criostato de congelamento (Modelo Cryocut 1800, Leica CM1850, Alemanha) para verificação microscópica do sítio de injeção. Foram incluídos na análise estatística apenas os animais com sítios de injeção localizados no NMnR.

Análise estatística

Os dados sobre LAT ou IMO durante o teste foram analisados por ANOVA de uma via seguida por teste post-hoc de Duncan.

Em todos os testes, a diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Na figura 1 pode-se observar os sítios de injeção, representados em figuras esquemáticas de cortes coronais retirados do Atlas de Paxinos e Watson (1986). O número de pontos na figura é menor do que o de animais utilizados devido à sobreposição de pontos.

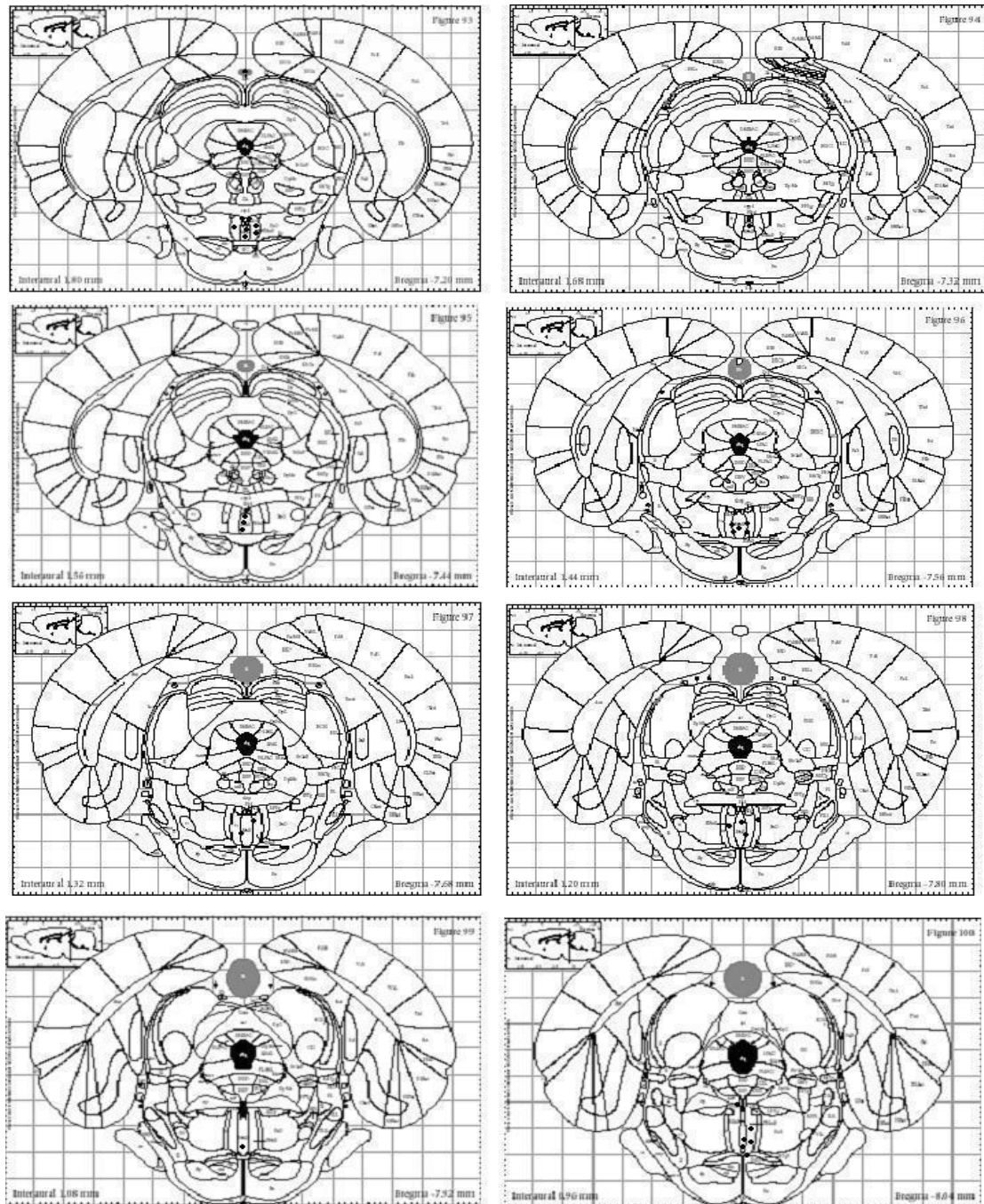


Figura 1: Representação esquemática dos sítios de injeção no NMnR em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Os círculos fechados representam os pontos de injeção intracerebral. O número de círculos é menor que o de animais utilizados devido à sobreposição de pontos.

Os resultados dos testes comportamentais encontram-se nas figuras de 2 a 7, mostrando os efeitos da administração de Salina + Salina (Sal+Sal), Salina + 8-OH-DPAT (Sal+DPAT), WAY100635 + Salina (WAY+Sal) e WAY100635 + 8-OH-DPAT (WAY+DPAT) sobre as médias \pm EPM (erro padrão da média) do LAT e IMO durante o teste de nado forçado, em cada condição experimental.

4.1 Estudo 1: Efeitos do tratamento intra-NMnR com 8-OH-DPAT e/ou WAY100635 administrados previamente ao estresse sobre o comportamento de ratos no teste do Nado Forçado (Inj+NF-T)

A figura 2 mostra as médias \pm EPM do LAT de animais tratados antes da pré-exposição ao estresse de nado forçado. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas dos efeitos dos tratamentos, nessa variável ($F_{3,36}=10,33$, $p<0,05$). O teste *post-hoc* de Duncan indicou que houve aumento significativo do tempo de latência ($p<0,05$) no grupo tratado com WAY+DPAT ($184 \pm 20,73$, $n=10$) em relação ao grupo controle (Sal+Sal= $74,76 \pm 12,37$, $n=13$), assim como em relação aos demais tratamentos (Sal+DPAT= $103 \pm 19,76$, $n=8$; WAY+Sal= $76,66 \pm 11,65$, $n=9$).

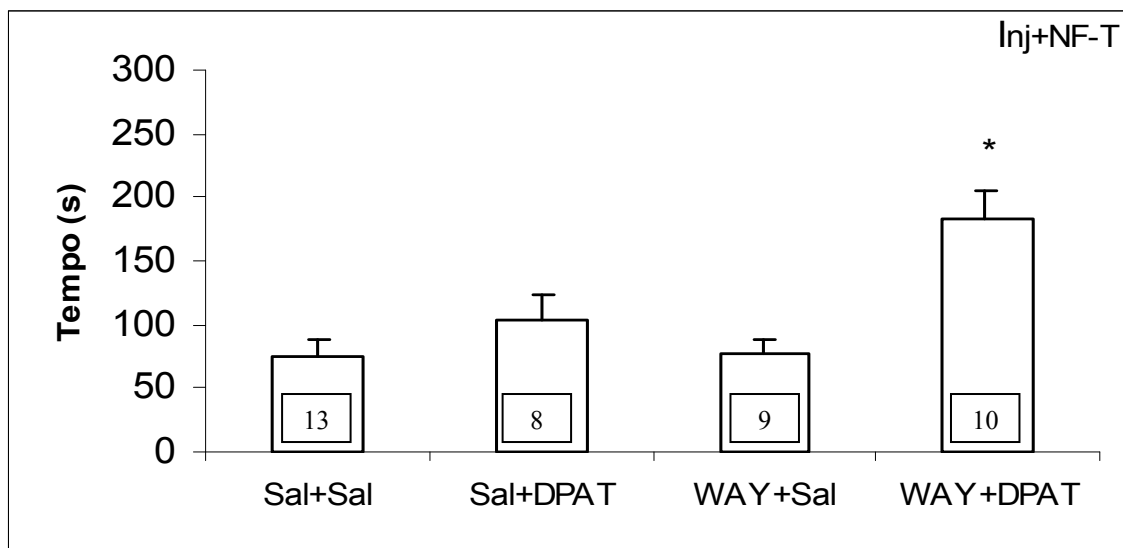


Figura 2: Tratamento com WAY100635 e 8-OH-DPAT aumenta a latência para o primeiro episódio de imobilidade quando administrado previamente à exposição ao estresse de nado forçado. Os animais receberam duas injeções intra-NMR, sendo a primeira de Salina ou WAY 100635 e, cinco minutos depois, a segunda injeção de Salina ou 8-OH-DPAT. Cinco minutos após a última injeção, os animais foram submetidos à pré-exposição ao nado forçado durante quinze minutos. Vinte e quatro horas depois foram submetidos ao teste de nado forçado. O número de animais de cada grupo é indicado dentro das barras. As barras representam a média \pm EPM da latência para o primeiro episódio de imobilidade (ANOVA de uma via seguida de Duncan, $p<0,05$). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (Sal+Sal).

Na figura 3, estão representadas as médias±EPM do IMO de animais que receberam tratamento antes da pré-exposição ao estresse de nado forçado. A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas dos efeitos dos tratamentos sobre o IMO ($F_{3,36}=12,41$, $p<0,05$). O teste *post hoc* indicou diminuição do IMO após tratamento com 8-OH-DPAT (Sal+DPAT=76,87 ± 8,80) e WAY+DPAT (51,1 ± 11,56), quando comparados ao controle (Sal+Sal=133,07 ± 9,59) (Duncan, $p<0,05$).

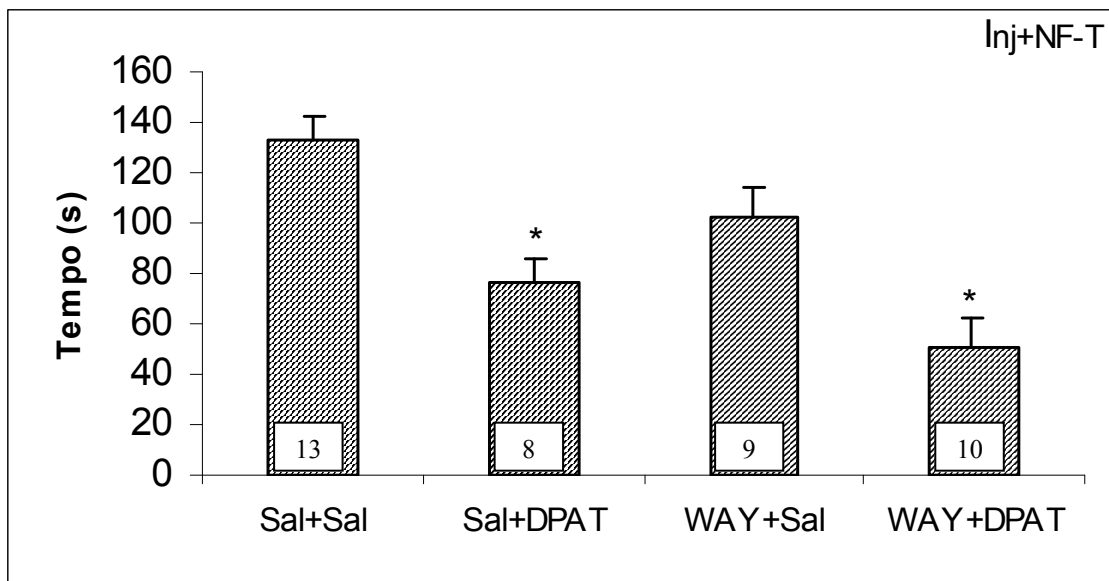


Figura 3: O tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado em ratos previamente estressados diminui após o tratamento com 8-OH-DPAT, e este efeito não é revertido pelo tratamento prévio com WAY 100635. Demais especificações na figura 2. As barras representam a média±EPM da latência para o primeiro episódio de imobilidade (ANOVA de uma via seguida de Duncan, $p<0,05$). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (Sal+Sal).

4.2 Estudo 2: *Efeitos do tratamento intra-NMnR com 8-OH-DPAT e/ou WAY100635 administrados imediatamente antes do teste sobre o comportamento de ratos previamente expostos (NF-Inj+T) ou não (Inj+T) ao estresse de Nado Forçado.*

A figura 4 apresenta as médias±EPM de LAT de animais estressados previamente e tratados antes do teste de nado forçado. ANOVA de uma via revelou diferença significativa dos diferentes tratamentos em relação ao LAT ($F_{3,21}=4,03$, $p<0,05$). Teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o grupo tratado com WAY+DPAT ($216 \pm 24,9$, $n=8$) aumentou significativamente o LAT ($p<0,05$) em relação ao grupo controle (Sal+Sal= $134,6 \pm 25,34$, $n=5$) e aos demais grupos (Sal+DPAT= $133,83 \pm 14,33$, $n=6$; WAY+Sal= $106,83 \pm 31,80$, $n=6$).

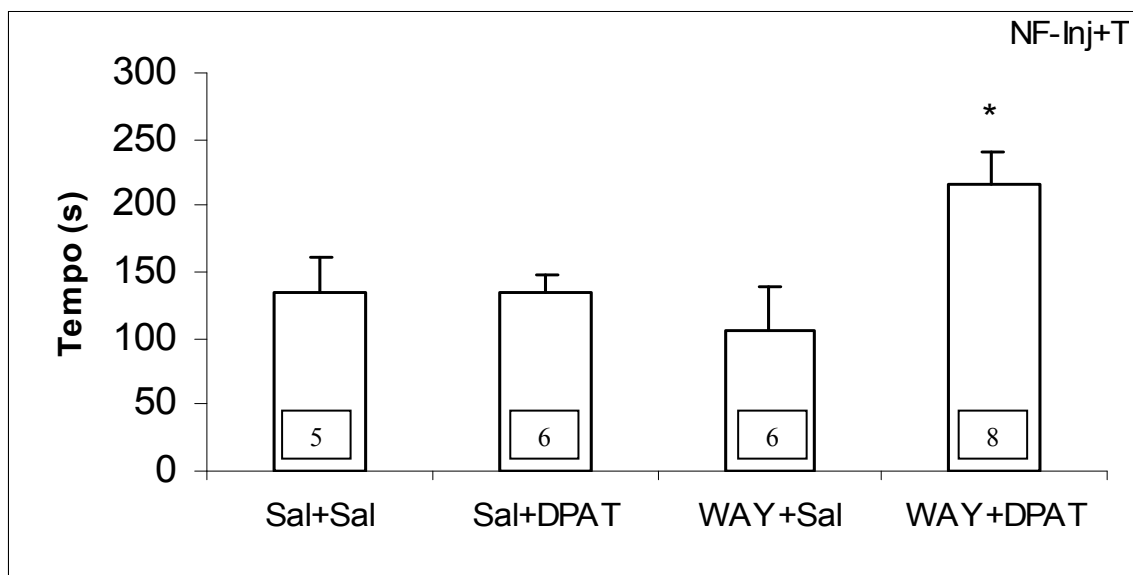


Figura 4: A latência para o primeiro episódio de imobilidade não se altera após tratamento com 8-OHDPAT em animais previamente estressados e tratados antes do teste de nado forçado. Os animais foram submetidos à pré-exposição ao nado forçado durante quinze minutos. Após vinte e quatro horas, receberam duas injeções intra-NMR, sendo a primeira de Salina ou WAY 100635 e, cinco minutos depois, a segunda injeção de Salina ou 8-OH-DPAT. Cinco minutos após a última injeção, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado. O número de animais de cada grupo é indicado dentro das barras. As barras representam a média±EPM da latência para o primeiro episódio de imobilidade (ANOVA de uma via seguida de Duncan, $p<0,05$). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (Sal+Sal).

As médias±EPM do IMO de animais que receberam tratamento antes do teste estão representados na figura 5. Nessa variável, também se observou que os efeitos dos tratamentos foram estatisticamente diferentes ($F_{3,21}=4,66$, $p<0,05$). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que o tratamento com WAY100635 seguido de 8-OH-DPAT (WAY+DPAT=15,12 ± 4,88) diminuiu o IMO em relação ao controle (Sal+Sal=81,2 ± 5,66), enquanto no grupo tratado com Sal+DPAT (37 ± 14,84) essa diminuição tendeu à significância ($0,10<p<0,05$). O grupo tratado apenas com WAY100635 (WAY+Sal=78,16 ± 27,01) não foi diferente do controle (ANOVA de uma via seguida de Duncan, $p<0,05$).

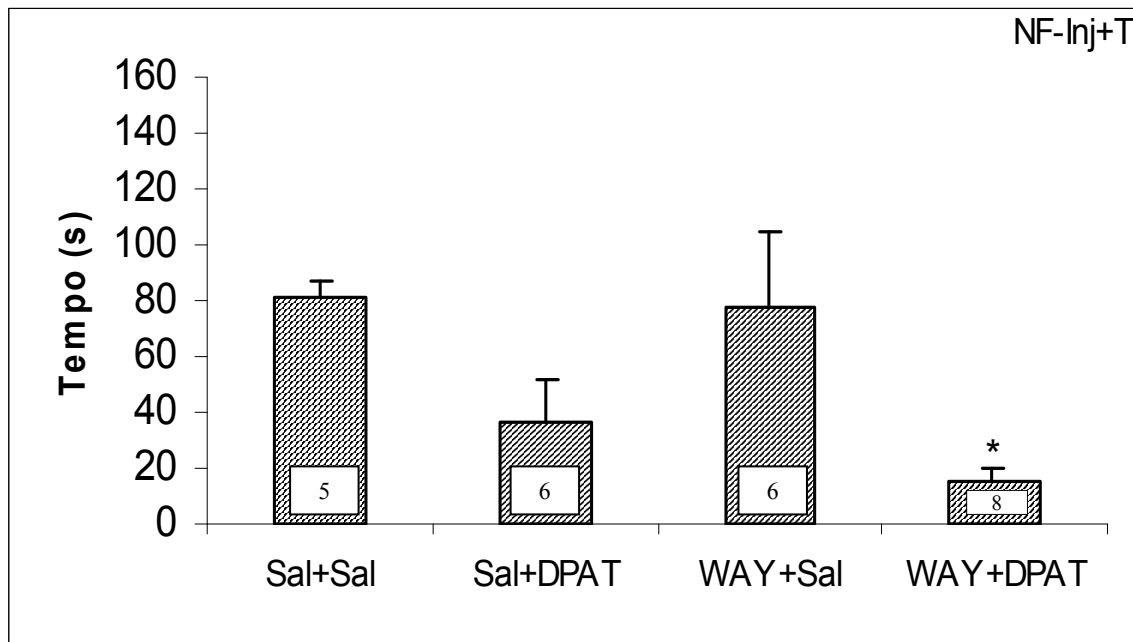


Figura 5: 8-OH-DPAT administrado no NMnR de ratos previamente estressados bloqueia a evocação da memória aversiva e este efeito não é antagonizado pelo tratamento prévio com WAY100635. Demais especificações na figura 4.

Os animais não submetidos à pré-exposição ao nado forçado têm suas médias \pm EPM do LAT apresentados na figura 6. A ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan não revelou efeito significativo dos tratamentos (Sal+Sal=115,57 \pm 14,22, n=7; Sal+DPAT=154 \pm 16,04, n=5; WAY+Sal=180,6 \pm 19,21, n=5; WAY+DPAT=138,71 \pm 20,22, n=7) sobre o LAT ($F_{3,20}=2,27$, $p>0,05$).

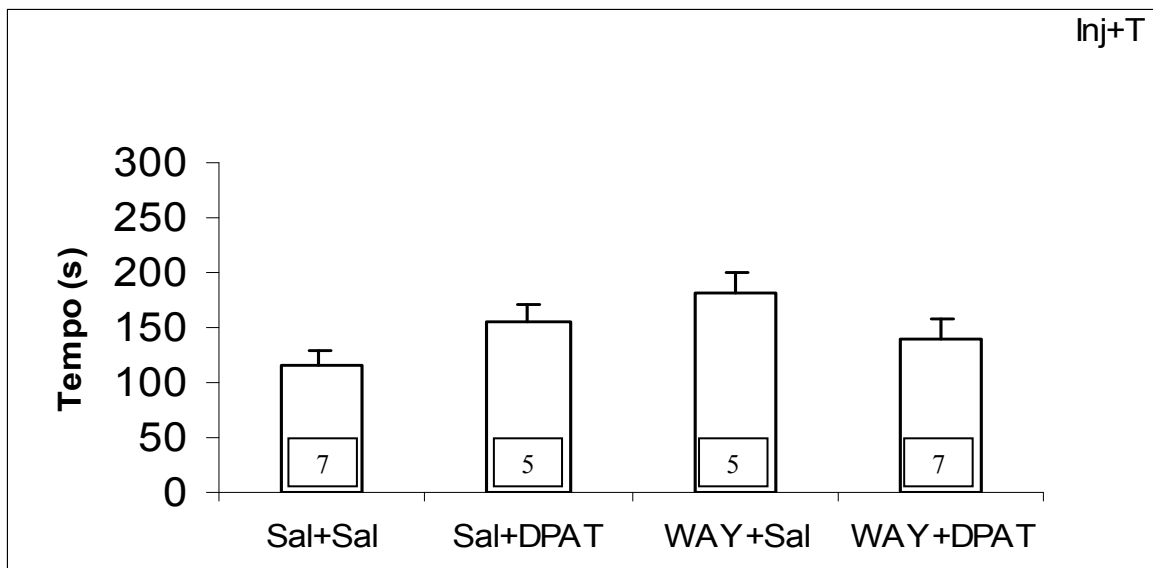


Figura 6: Ausência de efeito do 8-OH-DPAT e/ou WAY100635 intra-NMR sobre a latência para o primeiro episódio de imobilidade em animais não estressados previamente e tratados antes do teste de nado forçado. Os animais receberam duas injeções intra-NMR, sendo a primeira de Salina ou WAY 100635 e, cinco minutos depois, a segunda injeção de Salina ou 8-OH-DPAT, e foram submetidos ao teste de nado forçado cinco minutos após a última injeção. O número de animais de cada grupo é indicado dentro das barras. As barras representam a média \pm EPM da latência para o primeiro episódio de imobilidade (ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan).

Na figura 7, são mostradas as médias \pm EPM do IMO de animais não submetidos à pré-exposição ao nado forçado. Também, não se detectou efeito significativo dos diferentes tratamentos (Sal+Sal=42,71 \pm 10,26; Sal+DPAT=23,4 \pm 10,76; WAY+Sal=29 \pm 10,28; WAY+DPAT=26 \pm 9,53) sobre o IMO ($F_{3,20}=0,75$, $p>0,05$) (ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan).

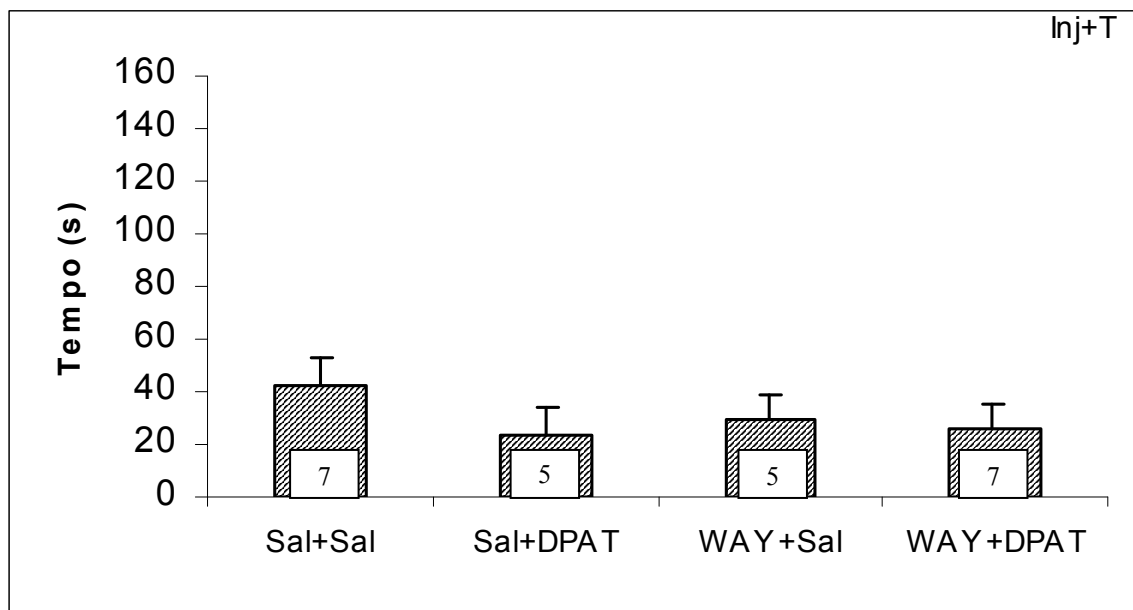


Figura 7: Ausência de efeito do 8-OH-DPAT ou WAY100635 intra-NMR sobre o tempo total de imobilidade em animais não estressados previamente e tratados antes do teste de nado forçado. Demais especificações na Figura 6.

5. DISCUSSÃO

A exposição crônica a eventos aversivos incontroláveis tem sido relacionada à etiologia de transtornos de humor como a depressão (POST, 1992). Em laboratório, a exposição de animais a eventos incontroláveis e severos induz alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes aos encontrados na depressão humana (ANISMAN; ZACHARKO, 1992). Há evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico nessas alterações (KENNETT et al, 1985; KENNETT, et al, 1987; ROBERTSON et al, 2005).

Segundo Deakin e Graeff (1991), a via serotoninérgica NMnR-hipocampo dorsal seria responsável por desconectar as associações aversivas das conseqüências comportamentais delas decorrentes, aumentando a resistência/tolerância ao estresse. Uma disfunção nessa via estaria envolvida no desenvolvimento das alterações induzidas pelo estresse.

O nado forçado (PORSOLT et al, 1977) é um estímulo aversivo utilizado para indução de estresse em animais de laboratório e que promove alterações da atividade serotoninérgica cerebral como alteração na concentração de 5-HT ou na densidade de 5-HT_{1a}R em regiões como córtex pré-frontal medial, hipocampo ou núcleos da rafe (ADELL et al, 1997; BRIONES-ARANDA et al, 2005, 2009; JORDAN et al, 1994; KIRBY et al, 2007). A imobilidade durante o teste tem sido interpretada como um estado de desespero em que o animal se resigna às condições do experimento indicando que aprendeu, durante a pré-exposição, que não há como escapar do evento aversivo (PORSOLT et al, 1997). Essa experiência aprendida pode ser alterada pela administração de drogas no momento da aquisição ou evocação, uma vez que há indícios de que os processos de memória são tempo-dependentes (AMARAL et al, 2007; McGAUGH; ROOZENDAAL, 2009). Há evidências do envolvimento de receptores serotoninérgicos nesses processos como, por exemplo, prejuízo no teste de retenção da esQUIVA passiva quando 8-OH-DPAT é administrado antes do treino ou facilitação da retenção quando antagonista 5-HT_{1a}R é administrado (MENESES; PEREZ-GARCIA, 2007; ÖGREN et al, 2008; SANTUCCI; CARDIELLO, 2004).

O presente estudo investigou a participação de 5-HT_{1a}R do NMnR nas conseqüências comportamentais da exposição ao estresse de nado forçado, intervindo farmacologicamente em diferentes momentos em relação a exposição a esse estressor, utilizando-se agentes agonista e antagonista com afinidade sobre esses receptores.

No Estudo 1, investigamos os efeitos do tratamento intra-NMnR com WAY100635 e/ou 8-OH-DPAT antes da pré-exposição ao nado forçado. Nesse estudo, observamos primeiramente que o tratamento com o 8-OH-DPAT promoveu uma diminuição no tempo de

imobilidade total, sem, no entanto, alterar significativamente a latência para o primeiro episódio de imobilidade.

A explicação para essa aparente discrepância não é clara. Entretanto, se considerarmos o tempo total de imobilidade fica evidente que o tratamento com o 8-OH-DPAT foi capaz de prevenir a aquisição da memória aversiva relacionada ao estresse de nado forçado, o que promoveu uma adaptação do animal quando re-exposto ao mesmo contexto.

Esses resultados estão de acordo com trabalhos em que administração de 8-OH-DPAT antes do treino, num mesmo contexto do teste, preveniu a aquisição da associação aversiva no modelo de medo condicionado ao contexto (AVANZI; BRANDAO, 2001; STIEDL et al, 2000). Além dessas evidências, os resultados observados após o tratamento com 8-OH-DPAT são reforçados por dados anteriores de nosso laboratório, nos quais observamos atenuação dos efeitos do estresse de nado forçado quando o 8-OH-DPAT foi administrado no NMnR imediatamente após o estresse prévio (24 horas antes do teste) (ALMEIDA, PEREIRA; PADOVAN, *in prep.*). Resultados semelhantes também foram observados com a administração de Zimelidina, um bloqueador de recaptção de serotonina, nessas mesmas condições (ALMEIDA, PEREIRA; PADOVAN, *in prep.*). Além disso, em animais não estressados, mas que receberam esses tratamentos vinte e quatro horas antes do teste, não foram observadas alterações de seus comportamentos.

Em conjunto, os dados obtidos após o tratamento com 8-OH-DPAT sugerem que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no NMnR imediatamente antes ou depois da exposição prévia ao estresse interfere na aquisição ou consolidação da memória, respectivamente. E, ainda, que os efeitos observados em animais previamente estressados é decorrente de uma interação entre os efeitos farmacológicos dos fármacos utilizados e os efeitos desencadeados pela exposição ao estresse de nado forçado. Sendo assim, demos continuidade ao estudo administrando o WAY100635 previamente ao 8-OH-DPAT (WAY+DPAT), ou isoladamente (WAY+Sal), buscando antagonizar os efeitos previamente observados com o 8-OH-DPAT.

O tratamento isolado com WAY100635 não alterou os tempos de latência e de imobilidade dos animais, quando os mesmos foram comparados ao grupo controle (Salina+Salina). Entretanto, quando administrado previamente ao 8-OH-DPAT, observou-se um aumento na latência para o primeiro episódio de imobilidade e também uma diminuição no tempo total gasto imóvel. Esses resultados sugerem que o tratamento com WAY100635 não foi capaz de antagonizar os efeitos produzidos pelo 8-OH-DPAT.

Dados da literatura mostram que o tratamento prévio com WAY100635 antagoniza os efeitos do tratamento com 8-OH-DPAT (FILE et al, 1996; STIEDL et al 2000; VICENTE et al, 2008). Entretanto, isso não foi observado em nosso estudo.

A explicação para esse resultado pode estar relacionada a hipóteses distintas, porém não mutuamente exclusivas. A primeira delas baseia-se na possibilidade de, a dose de WAY 100635 por nós utilizada nesse estudo (0,3nmol/0,2µl) não ter sido suficiente para antagonizar os efeitos do 8-OH-DPAT, somados aos efeitos desencadeados pelo estresse de nado forçado. Entretanto, essa dose, assim como a utilizada para o 8-OH-DPAT, foi baseada em dados da literatura que mostravam o antagonismo dos efeitos da ativação de 5-HT_{1a}R pelo 8-OH-DPAT no NMnR (DOS SANTOS et al., 2005; SANBERG et al., 2006).

Uma segunda possibilidade para explicar essa ausência de efeito antagonista do WAY100635 sobre os efeitos do 8-OH-DPAT envolve a ativação de receptores 5-HT₇. Dados da literatura sugerem que o 8-OH-DPAT atua tanto sobre 5-HT_{1a}R (ADELL et al, 1993; ADELL; ARTIGAS, 1998; BOSKER et al., 1994), quanto sobre 5-HT₇R (BARD et al., 1993; LOVENBERG et al., 1993; RUAT et al., 1993; THOMAS et al., 1998). Esses receptores encontram-se amplamente distribuídos pelo SNC, incluindo o NMnR (BONAVENTURE et al., 2002; NEUMAIER et al., 2001). Assim, nessa condição experimental, o tratamento com WAY 100635 antagonizaria a ativação dos 5-HT_{1a}R do NMnR pelo 8-OH-DPAT, mas não dos 5-HT₇R. Com isso, os efeitos comportamentais observados seriam decorrentes de tal ativação.

Vários trabalhos da literatura dão suporte ao papel dos 5-HT₇R na neurobiologia dos transtornos de humor. Por exemplo, Abbas et al. (2009) mostraram que os efeitos antidepressivos da amilsupirida são decorrentes de sua ação sobre os 5-HT₇R. Esse estudo foi realizado em camundongos selvagens e “*knock out*” para os 5-HT₇R, que foram submetidos a dois modelos animais de depressão, o Teste de Suspensão pela Cauda e o Teste do Nado Forçado e tratados com a amilsupirida.

Além disso, há evidências de que a ativação de 5-HT₇R tem efeito inibitório sobre a liberação de serotonina nos Núcleos da Rafe de roedores (DUNCAN et al., 1999; HARSING et al., 2004). Assim, poderíamos sugerir que a administração de 8-OH-DPAT no NMnR inibiria o aumento na liberação de serotonina, também por sua ação sobre os 5-HT₇R.

Uma terceira hipótese está relacionada aos efeitos do estresse de nado forçado sobre o sistema serotoninérgico, no que se refere à concentração de serotonina e a funcionalidade dos 5-HT_{1a}R.

Nesse sentido, estudos utilizando as técnicas de microdiálise e de HPLC (“*High Performance Liquid Chromatography*” – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) mostraram que o nado forçado induz aumentos na concentração de serotonina no NMnR (ADELL et al., 1997) e no hipocampo (LINTHORST et al., 2002) de roedores. Considerando-se que esses estudos avaliaram a concentração de serotonina após uma única exposição ao estresse de nado forçado, podemos sugerir que, durante a pré-exposição ao nado ocorra um aumento na concentração de 5-HT nessas estruturas. Contrariamente aos resultados obtidos pelo grupo de Adell et al. (1997), os estudos feitos por Briones-Aranda et al. (2005; 2009) mostraram um aumento nas concentrações de 5-HT apenas no hipocampo, mas não no NMnR. Além disso, esses pesquisadores observaram uma diminuição na densidade de 5-HT1aR tanto no hipocampo quanto no NMnR. Esses resultados levaram os pesquisadores a propor que a liberação aumentada de serotonina em resposta ao estresse promoveria uma dessensibilização dos 5-HT1aR.

Esse fenômeno de dessensibilização dos 5-HT1aR em resposta à serotonina liberada pela exposição ao estresse estaria ocorrendo, por exemplo, através de processos de internalização desses receptores. Nesse sentido, dados da literatura mostram que quinze ou até sessenta minutos após a administração aguda intravenosa de 8-OH-DPAT ocorre uma diminuição na densidade dos 5-HT1aR no Núcleo Dorsal da Rafe por internalização, retornando aos níveis basais em vinte e quatro horas após a administração desse fármaco (RIAD et al., 2001; ZIMMER et al., 2004). Assim sendo, a administração de 8-OH-DPAT diretamente no NMnR antes da exposição ao estresse de nado forçado aliada ao aumento na liberação de 5-HT em resposta a este estressor promoveriam a dessensibilização dos 5-HT1aR, possivelmente envolvendo processos de internalização desses receptores nessa estrutura.

Ainda no que se refere ao aumento na liberação de 5-HT em resposta ao estresse de nado forçado, há evidências de que a ativação de 5-HT7R tem efeito inibitório sobre a liberação de serotonina nos Núcleos da Rafe de roedores (DUNCAN et al., 1999; HARSING et al., 2004). Assim, poderíamos sugerir que a administração de 8-OH-DPAT no NMnR inibiria o aumento na liberação de serotonina, também por sua ação sobre os 5-HT7R, explicando, assim, a ausência de efeito antagonista do WAY 100635 administrado previamente ao 8-OH-DPAT.

As evidências anteriormente destacadas sobre o papel da 5-HT liberada no NMnR em resposta ao estresse aliadas aos efeitos observados após a administração de 8-OH-DPAT sugerem a existência de um controle tônico inibitório em condições basais, que atua sobre os

5-HT_{1a}R. Esse mecanismo já foi descrito para o Núcleo Dorsal da Rafe (NDR). Sabe-se que os neurônios serotoninérgicos do NDR recebem projeções noradrenérgicas do *Locus coeruleus* (PEYRON et al., 1996) e, além disso, estudos farmacológicos demonstraram que tais projeções são responsáveis pelo controle tônico da atividade de disparo dos neurônios serotoninérgicos nesse núcleo (HADDJERI et al, 2004). Nesse estudo, Haddjeri et al. (2004) observaram, na presença do antagonista WAY 100635, um aumento no número de disparos de neurônios serotoninérgicos de ratos anestesiados após lesão dos neurônios noradrenérgicos por 6-OH-DA (6-hidroxi-dopamina) oriundos do *Locus coeruleus*. Dados descritos anteriormente por Fornal et al. (1996) foram semelhantes aos obtidos por Haddjeri et al. Esses pesquisadores observaram que os neurônios serotoninérgicos do NDR de gatos acordados ou sob anestesia apresentavam alta taxa de disparos na presença de WAY 100635, as quais eram drasticamente reduzidas na presença de 8-OH-DPAT.

Se confirmado mecanismo semelhante no NMnR para os neurônios serotoninérgicos, esperaríamos que a administração isolada de WAY 100635 intensificasse ainda mais os efeitos do estresse, possivelmente por facilitar a ativação da via NMnR-Hipocampo e promover uma maior eficácia nos processos de memória relacionada ao evento aversivo. Entretanto, não observamos tais efeitos em nossos estudos.

Tomados em conjunto todos os resultados obtidos até então e os dados da literatura, podemos dizer que os tratamentos prévios ao estresse prévio seriam capazes de prevenir os aumentos induzidos pelo mesmo sobre a liberação de serotonina, prevenindo, conseqüentemente, os demais efeitos comportamentais ligados a este estressor.

Continuando nosso estudo, iniciamos a segunda etapa do mesmo, investigando os efeitos da facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT_{1a}R antes do teste em animais previamente expostos ao estresse de nado forçado.

Assim, como havia sido observado na condição anterior (Inj+NF-T), a administração de 8-OH-DPAT antes do teste em animais previamente estressados não alterou a latência para imobilidade (Figura 4). Entretanto, este tratamento diminuiu o tempo total gasto imóvel (Figura 5).

O tratamento com WAY 100635 isoladamente não alterou o tempo de latência e nem o tempo total gasto imóvel. Entretanto, quando administrado previamente ao 8-OH-DPAT o WAY 100635 não foi capaz de antagonizar os efeitos deste fármaco.

A explicação para estes resultados não é clara. Quando animais não estressados receberam os diferentes tratamentos antes do teste (Inj+T; grupos controle do Estudo 2, vide

Figuras 6 e 7), não foram observadas alterações nas variáveis analisadas em relação ao grupo tratado com Salina.

Assim sendo, podemos supor que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT_{1a}R imediatamente antes do teste é capaz de atenuar os efeitos da exposição prévia ao nado forçado. Tal atenuação poderia envolver um bloqueio na evocação de memórias aversivas relacionadas à exposição prévia ao nado forçado.

Vários trabalhos na literatura sugerem a existência de uma circuitaria temporal, essencial para os processos de aquisição, consolidação e evocação de memórias (IZQUIERDO E MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 2006). Em resumo, os trabalhos sugerem que, dependendo do momento em que, por exemplo, uma intervenção farmacológica ocorre, e também da estrutura cerebral onde essa intervenção é realizada, esses processos relacionados à memória serão alterados (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 2006; PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; ZANATTA et al., 1997,).

No que se refere ao hipocampo, vários trabalhos da literatura mostraram que o momento em que ocorre a interferência sobre a neurotransmissão serotoninérgica ou glutamatérgica é determinante nas conseqüências desencadeadas pelo agente estressor e também parece depender do agente estressor utilizado. Por exemplo, a administração de zimelidina (bloqueador de recaptção de serotonina) ou de 8-OH-DPAT no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após a pré-exposição foi capaz de atenuar as conseqüências comportamentais da exposição ao estresse de restrição (PADOVAN; GUIMARÃES, 1993) ou choque elétricos inescapáveis (JOCA et al., 2003).

Outro neurotransmissor importante para a circuitaria do hipocampo e dos processos de memória e aprendizado é o glutamato. O bloqueio de receptores de glutamato de tipo NMDA no hipocampo promoveu atenuação dos efeitos comportamentais do estresse de imobilização forçada somente quando este tratamento foi realizado imediatamente após a exposição a este estressor, ou vinte e quatro horas antes (imediatamente antes do teste) (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000b). Diferentemente do observado com o estresse de imobilização, as conseqüências comportamentais da pré-exposição ao Nado Forçado só foram atenuadas com a administração intra-hipocampal de AP-7 imediatamente após o episódio estressante (PADOVAN; GUIMARÃES, 2004). Ainda, a atenuação dos efeitos da exposição a choques elétricos inescapáveis, somente foi observada quando o AP-7 foi administrado no hipocampo antes da pré-exposição, ou imediatamente antes do teste em animais estressados.

Embora a explicação para as diferenças observadas não sejam claras, é possível que não só a natureza do estímulo estressor, como também sua duração e intensidade levem a

alterações expressivas no funcionamento da formação hipocampal e na circuitaria a ela associada, e que resultam nas diferenças comportamentais observadas.

Entretanto, como comentado anteriormente, a formação hipocampal possui conexões recíprocas com o NMnR e que funcionalmente estão relacionadas à adaptação a eventos aversivos.

Além disso, vários trabalhos sugerem que a própria serotonina tenha um controle tônico inibitório sobre os neurônios do NMnR, como já mencionado anteriormente. Assim sendo, é possível que, momentos antes do teste, a administração de 8-OH-DPAT tenha promovido a desconexão das memórias aversivas relacionadas ao episódio estressante, possivelmente impedindo a evocação de tais memórias.

Em conjunto, estas evidências reforçam a proposição de que a exposição prévia ao estresse induz alterações plásticas funcionais e/ou morfológicas que estão associadas aos efeitos comportamentais observados.

Nossos resultados corroboram dados da literatura mostrando que o 8-OH-DPAT possui efeitos na via NMnR-hipocampo, afetando a memória aversiva pela intervenção no sistema serotoninérgico, com participação de 5-HT_{1a}R (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GUIMARAES et al, 1993). Além disso, também é sugerida a participação de 5-HT₇ no NMnR nos processos de aquisição e expressão da memória aversiva.

6. CONCLUSÃO

- O tratamento intra-NMnR com 8-OH-DPAT imediatamente antes da pré-exposição ou do teste em animais estressados diminui o tempo de imobilidade durante o teste, prevenindo ou atenuando, respectivamente, as conseqüências comportamentais da exposição prévia ao estresse de nado forçado.
- A administração conjunta de WAY 100635 previamente ao 8-OH-DPAT no NMnR não antagonizou os efeitos desse agonista sobre a latência para o primeiro episódio de imobilidade e sobre o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.I.; HEDLUND, P.B.; HUANG, X.P.; TRAN, T.B.; MELTZER, H.Y.; ROTH, B.L. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. **Psychopharmacology (Berl)**, v.205, n.1, p.119-128, 2009.

ADELL, A.; CASANOVAS, J. M.; ARTIGAS, F. 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.735-741, 1997.

ADELL, A.; ARTIGAS, F. A microdialysis study of the *in vivo* release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.125, p.1361-1367, 1998.

ADELL, A.; ARTIGAS, F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. **European Journal of Neuroscience**, v.11, p.2305-2311, 1999.

AMARAL, O. B.; LUFT, T.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; ROESLER, R. Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory. **Behavioural Brain Research**, v.180, p.113-118, 2007.

ANDRADE, T.G.; GRAEFF, F.G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.70, p.1-14, 2001.

ANISMAN, H; ZACHARKI, R. M. Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. **British Journal Psychiatry**, v.160, p.36-43. Supplement 15.

ARTIGAS, F; NUTT, D.J; SHELTON, R. Mechanism of action of antidepressants. **Psychopharmacology Bulletin**, v.36, p.123-132, 2002. Supplement 2.

ASSOCIAÇÃO NORTE-AMERICANA DE PSIQUIATRIA. **Manual estatístico e diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV)**, 4^a edição. 1994. Disponível em: <<http://virtualpsy.locaweb.com.br/dsm.php>>. Acesso em 10 de Nov. 2009.

AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. 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, 2001.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.179, p.641-668, 1978.

AZMITIA, E.C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v.56, n.5, p.413-424, 2001.

BARD, J.A.; ZGOMBICK, J.; ADHAM, N.; VAISSE, P.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R.L. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. **Journal Biological Chemistry**, v.268, n.31, p.23422-23426, 1993.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083-1152, 1999.

BLIER, P.; MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **TiPS**, v.15, p.220-226, 1994.

BLIER, P. The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. **European Neuropsychopharmacology**, v.13, p.57-66, 2003.

BONAVENTURE, P.; NEPOMUCENO, D.; KWOK, A.; CHAI, W.; LANGLOIS, X.; HEN, R.; STARK, K.; CARRUTHERS, N.; LOVENBERG, T.W. Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT(1A) knockout and 5-HT(1A/1B) double-knockout mice. **Journal Pharmacol Exp Ther.** v.302, n.1, p.240-248, 2002.

BORSISNI, F. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. **Neuroscience and Behavioural Reviews**, v.19, n.3, p. 377-395, 1995.

BOSKER, F.; KLOMPMAKERS, A.; WESTENBERG, H. Extracellular 5-hydroxytryptamine in media raphe nucleus of the conscious rat is decreased by nanomolar concentrations of 8-hydroxy-2-(Di-n-Propylamino) tetralin and is sensitive to tetrodotoxin. **Journal of Neurochemistry**, v.63, p.2165-2171, 1994.

BREMNER, J. D.; NARAYAN, M.; ANDERSON, E. R.; STAIB, L. H.; MILLER, H. L.; CHAMEY, D. S. Hippocampal volume reduction in major depression. **American Journal Psychiatry**, v.157, p.115-117, 2000.

BRIONES-ARANDA. A.; ROCHA, L.; PICAZO, O. Influence of forced swimming stress on 5-HT_{1A} receptors and serotonin levels in mouse brain. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 275-281, 2005.

BRIONES-ARANDA, A.; CASTILLO-SALAZAR, M.; PICAZO, O. Adrenalectomy modifies the hippocampal 5-HT_{1A} receptors and the anxiolytic-like effect of 8-OH-DPAT in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, p. 182-189, 2009.

BUDZISZEWSKA, B. effect of antidepressant drugs on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and glucocorticoid receptor function. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, p. 343-349, 2002.

CASTRÉN, E. is mood chemistry? **Nature Reviews**, v. 6, p. 241-246, 2005.

CHALMERS, D. T.; WATSON, S. J. Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in the rat brain – a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. **Brain Research**, v. 561, p. 51-60, 1991.

CRYAN, J. F; MARKOU, A; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

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

DORIS, A.; EBMEIER, K.; SHAJAHAN, P. Depressive illness. **The Lancet**, v. 354, p. 1369-1375, 1999.

DOS SANTOS, L.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI JR, H. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze test of anxiety. **Psychopharmacol (Berl.)**, v. 179, p.733-741, 2005.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1136-43, 2006.

DUNCAN, M. J; SHORT, J; WHEELER, D. L. Comparison of the effects of aging on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. **Brain Research**, v. 829, p. 39-45, 1999.

FILE, S.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **Journal of Neuroscience**, v.16, n. 15, p. 4810-4815, 1996.

FORNAL, C. A; METZLER, C. W.; GALLEGOS, R. A.; VEASEY, S. C.; McCREARY A.C.; JACOBS, B.L. WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.278, n.2, p.752-762, 1996.

GOULD, E.; TANAPAT, P. Stress and hippocampal neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v.46, p.1472-1479, 1999.

GRAEFF, F. G. Drogas usadas no tratamento das desordens afetivas. In: _____. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2^a edição. São Paulo: EPU, 1989. cap IV, p.41-60.

GRAEFF, F. G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Reviews Neurosciences**, v.4, n.2, p. 181-211, 1993.

GRAEFF F. G.; GUIMARÃES, F. S.; ANDRADE, T.G.; DEAKIN, J.F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n.1, p. 129-41, 1996.

GRAEFF, F.G. Serotonergic systems. **Psychiatric Clinics North America**, v. 20, n. 4, p. 723-39, 1997.

GREEN, A.R. The cerebral regulation of 5-hydroxytryptamine synthesis and metabolism in relation to functional physiological effects. In: BOULLIN, D.J. **Serotonine in mental abnormalities**, Editora John Wiley & Sons, 1978. cap.3, p.71-94.

GREEN, A. R. Neuropharmacology of 5-Hydroxytryptamine. **British Journal Pharmacology**, v.147, p. 145-152, 2006. Supplement

GREVET, E.H.; KNIJNIK, L. Diagnóstico de depressão maior e distímia. **Revista AMRIGS**, v. 45, n. 3/4 , p. 108-110, 2001.

GUIMARÃES, F. S. Modelos experimentais de doenças mentais. **Revista ABP-APAL**, v. 15, n. 4, p. 149-152, 1993.

GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E. A.; PADOVAN, C. M.; NETTO, S. M.; TITZE DE ALMEIDA, R. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 133-9, 1993.

GUIMARÃES, F. S. Distúrbios afetivos. In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 4^a edição. São Paulo: Lemos Editora, 1997. cap 4, p. 79-108.

GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; MOLINA, V. A. Mood disorders. In: BRANDÃO, M. L & GRAEFF, F. G. **Neurobiology of mental disorders**. New York: Nova Science Publishers, 2006. Cap. 5, p. 95-123.

HADDJERI N.; LAVOIE, N.; BLIER, P. Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT_{1A} autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacology**, v.29, p. 1800-1806, 2004.

HARSING JR. L. G.; PRAUDA I.; BARKOCZY, J.; MATYUS, P.; JURANYI, Z. A 5-HT₇ heteroreceptor-mediated inhibition of [3H] serotonin release in raphe nuclei slices of the rat: evidence for a serotonergic-glutamatergic interaction. **Neurochemical Research**, v. 29, n.8, p.1487-1497, 2004.

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

HORNUNG, J.P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal Chemical Neuroanatomy**, v.26, p.331-343, 2003.

HUANG, Y.H.; CHENG, C.Y.; HONG, C.J.; TSAI, S.J. Expression of c-Fos-like immunoreactivity in the brain of mice with learned helplessness. **Neuroscience Letters**, v.363, p.280-283, 2004.

ILGEN, M. A.; HUTCHISON, K. E. A history of major depressive disorder and the response to stress. **Journal of Affective Disorder**, v. 86, p. 143-150, 2005.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **TRENDS in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006.

JOCA, S. R.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Activation of post-synaptic 5-HT(1A) receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Research**, v. 978, n. 1/2, p. 177-184, 2003.

JORDAN, S.; KRAMES, G. L.; ZUKAS, P. K.; PETTY, F. Previous stress increases in vivo biogenic amine response to swim stress. **Neurochemical Research**, v. 12, p. 1521-1525, 1994.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism**, v. 54, p. 24-27, 2005. Suppl 1.

KAPLAN, H. I.; SANDOCK, B.J.; GREBB, J. A. **Compêndio de psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica**. 7^a ed., Artmed: Porto Alegre, 1997.

KENNETT, G. A.; DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Enhancement of some 5-HT dependent behavioral responses following repeated immobilization in rats. **Brain Research**, v. 330, p. 253-263, 1985.

KENNETT, G. A.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. Antidepressant-like action of 5-HT1A agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. **European Journal Pharmacology**, v. 134, p. 265-274, 1987.

KIRBY, L.G.; PAN, Y.Z.; FREEMAN-DANIELS, Z.; RANI, S.; NUNAN, J.D.; AKANWA, A.; BECK, S. G. Cellular effects of swim stress in the dorsal raphe nucleus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 712-723, 2007.

LIMA, M. S. Epidemiologia e impacto social. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1999.

LINTHORST, A. C. E.; PEÑALVA, R. G.; FLACHSKAMM, C.; HOLSBOER, F.; REUL, J. M. H. forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing hormone receptor-dependent mechanism. **European Journal Neuroscience**, v. 16, p. 2441-2452, 2002.

LOVENBERG, T.W.; BARON, B.M.; DE LECEA, L.; MILLER, J.D.; PROSSER, R.A.; REA, M.A.; FOYE, P.E.; RACKE, M.; SLONE, A.L.; SIEGEL, B.W.; DANIELSON, P.E.;

SUTCLIFFE, J.G.; ERLANDER, M.G. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. **Neuron**, v.11, n.3, p.449-458, 1993.

LUNA-MUNGUÍA, H.; MANUEL-APOLINA, L.; ROCHA, L.; MENESES, A. 5-HT_{1A} receptor expression during memory formation. **Psychopharmacology**, v. 181, p. 309-318, 2005.

MAGARIÑOS, A. M.; McEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons : comparisons of stressors. **Neuroscience**, v. 69, n.1, p. 83-88, 1995.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.C; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 541-547, 2001.

McEWEN, B. S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. **Metabolism** , v.54, p. 20-3, 2005. Supplement 1.

McEWEN B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873-904, 2007.

McGAUGH, J.L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, p. 3-14, 2009.

MENESES, A.; PEREZ-GARCIA, G. 5-HT_{1A} receptors and memory. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 705-727, 2007.

MURRAY, C. J. L; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2002: global burden of disease study. **The Lancet**, v. 349, p. 1498-1504, 1997.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DiLEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**.2002, 34: 13-25.

NETTO, S. M.; GUIMARÃES, F. S. 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.

NETTO, S. M.; ILVEIRA, R.; COIMBRA, N. C.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. **Progress Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v.26, p. 1135-1141, 2002.

NEUMAIER, J.F.; SEXTON, T.J.; YRACHETA, J.; DIAZ, A.M. Brownfield M. Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. **Journal Chemical Neuroanatomy**, v.21, n.1, p.63-73, 2001.

ÖGREN, S.O; ERIKSSON, T.M; ELVANDER-TOTTIE, E; D'ADDARIO, C; EKSTROM, J.C.; SVENNINGSSOM, P.; MEISTER, B.; KEHR, J.; STIEDL, O. The role of 5-HT1A receptors in learning and memory. **Behavioral Brain Research**, v. 195, p. 54-77, 2008.

O'NEIL, M.F.; MOORE N.A. Animals models of depression: Are there any? **Human Psychopharmacol: Clinical and Experimental**, v.18, p. 239-254, 2003.

OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. **Clinical Chemistry**, v. 40/2, p.288-295, 1994.

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

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

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

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, p.15-19, 2004.

PAZOS, A.; PALACIOS, J.M.; Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I.Serotonin-1 receptors. **Brains Research**, v. 356, p. 205-230, 1985.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. New York: Academic Press, 1986.

PEREZ-GARCIA, G.; MENESES, A. Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. **Behavioral Brain Research**, v.195, p.17-25, 2008.

PEYRON, C.; LUPPI, P.H.; FORT, P.; RAMPON, C.; JOUVET, M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. **Journal Comparative Neurology**, v.364, n.3, p.402-413, 1996.

PORSOLT, R.D; LE PICHON, M; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977.

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

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research**, v.84, n.1-2, p.241-246, 1997.

RANG, H.P.; DALE M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 5a edição, Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004. 920 p.

RIAD, M.; WATKINS, K.C.; DOUCET, E.; HAMON, M.; DESCARRIES, L. Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (Autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n.21, p. 8378-8386, 2001.

ROBERTSON, D.A.F.; BEATTIE, J.E.; REID, I.C.; BALFOUR, D.J.K. Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: the role of serotonin and stress. **European Journal Neuroscience**, v. 21, p. 1511-1520, 2005.

RUAT, M.; TRAIFFORT, E.; LEURS, R.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; DIAZ, J.; ARRANG, J.M.; SCHWARTZ, J.C. **Proceedings National Academy Science USA**, v.90, n.18, p.8547-8551, 1993.

SANBERG, C. D.; JONES, F. L.; DO, V. H.; DIEGUEZ JR, D.; DERRICKB. E. 5-HT1A receptor antagonists block perforant path-dentate LTP induced in novel, but not familiar, environments. **Learning & Memory**, v.13, p. 52-62, 2006.

SANTUCCI, A.C.; CARDIELO, J. memory reactivation in rats treated with the 5-HT1A agonist 8-Oh-DPAT: a case of gone, but no forgotten. **Behavioral Neuroscience**, v.118, n. 1, p. 248-252, 2004.

SELIGMAN, M.E.P.; BEAGLEY, G. Learned helplessness in the rat. **Journal Comparative Physiological Psychology**, v.88, n.2, p.534-541, 1975.

SONENREICH, C; ESTEVÃO, G.; FRIEDRIC, S.; SILVA FIILO, L.M.A. A evolução histórica do conceito de depressão. **Revista ABP-APAL**. v. 17, n.1, p. 29-40, 1995.

STIEDL, O; MISANE, I; SPIESS, J; ÖGREN, S.O. Involvement of the 5-HT1A receptors in classical fear conditioning in C57bL/6J mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 22, p. 8515-8527, 2000.

TAO R, AUERBACH SB. Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. **Brain Research**, v. 961, n. 1, P. 109-20, 2003.

THOMAS, D.R.; GITTINS, S.A.; COLLIN, L.L.; MIDDLEMISS, D.N.; RILEY, G.; HAGAN, J.; GLOGER, I.; ELLIS, C.E.; FORBES, I.T.; BROWN, A. M. Functional characterization of the human cloned 5-HT7 receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. **British Journal Pharmacology**, v. 124, p. 1300-1306, 1998.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema integrado de bibliotecas. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Parte I (ABNT)**. 2ª ed., São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/info/Caderno_Estudios_9_PT_1.pdf>. Acesso em: 25 out 2009.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI JR, H.; DOS SANTOS, L.; MACEDO, C.E.; ANDRADE, T. G. C. S. Involvement of median raphe nucleus 5-Ht1A receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. **Neuroscience Letters**, v. 445, p. 204-208, 2008.

VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **Journal Comparative Neurology**, v. 407, p. 555-82, 1999.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 45, p. 425-455, 1990.

WONG, M.L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 343-51, 2001.

ZANATTA, M.S.; QUILLFELDT, J.H.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; QUEVEDO, J.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal

cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.2, p.235-240, 1997.

ZIMMER, L.; RIAD, M.; RBACH, L; BELKACEM-KAHLOULI, A; LE BARS, D.; RENAUD, B.; DESCARRIES, L. Toward brain imaging of serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor internalization. **NeuroImage**, v. 22, p.1421-1426, 2004.