

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

“Papel de receptores de serotonina de tipo 5-HT₇ do Núcleo Mediano da Rafe na resposta ao estresse de restrição”

Willian Lazarini Lopes

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ribeirão Preto – SP

2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

“Papel de receptores de serotonina de tipo 5-HT₇ do Núcleo Mediano da Rafe na resposta ao estresse de restrição”

Willian Lazarini Lopes

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maria Padovan

Ribeirão Preto – SP

2014

Parecer da Banca Examinadora

O trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas que se intitula “Papel de receptores de serotonina de tipo 5-HT₇ do Núcleo Mediano da Rafe na resposta ao estresse de restrição”

O aluno obteve a nota () com distinção e louvor.

Ribeirão Preto, 27 de Novembro de 2014 .

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Agradecimentos

A Prof^a. Dra. Cláudia Maria Padovan, pela oportunidade de desenvolver minha Iniciação Científica em seu laboratório e por ser uma excelente orientadora, dando suporte e atenção sempre que a procurei.

Aos meus companheiros do Laboratório de Neurobiologia do Estresse e da Depressão (LNED) e ao pessoal do Laboratório de Farmacologia da EERP que estiveram sempre presentes, sendo sempre ótimas companhias no laboratório.

Ao meu pai Roberto e a minha mãe Cristina, pelo apoio e pela paciência que tiveram comigo até aqui.

Aos meus amigos e companheiros da quadragésima oitava turma do curso de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (a nossa BIO 48), por esses quatro anos de crescimento e desenvolvimento, tanto pessoal, quanto intelectual.

Aos meus amigos da República Aluguel (Yuri, Garrafinha, Coruja e Marcella), pelo companheirismo, pela convivência e pela amizade.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Dedicatória

*A todos aqueles que, de alguma forma,
estiveram e estão próximos de mim, fazendo
esta vida valer cada vez mais a pena.*

Resumo

Lopes, W. L. **Papel de receptores de serotonina de tipo 5-HT₇ do Núcleo Mediano da Rafe na resposta ao estresse de restrição.** 2014. Monografia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

Palavras chaves: serotonina, estresse, depressão, núcleo mediano da rafe, 5-HT₇.

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor que regula diversos processos fisiológicos e comportamentais e está envolvida na adaptação a eventos aversivos, como a imobilização forçada. Disfunções no sistema serotoninérgico estão associadas a diversos transtornos psiquiátricos, como a depressão, dessa forma, o tratamento crônico com drogas antidepressivas aumenta a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica. As projeções serotoninérgicas que partem do Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) em direção ao Hipocampo Dorsal, seriam as responsáveis pela adaptação ao estresse. Além do receptor 5-HT_{1A}, o receptor 5-HT₇, presente em diversas estruturas encefálicas, dentre elas, o hipocampo e o NMnR, vem ganhando destaque devido ao seu provável papel na adaptação ao estresse e na gênese da depressão, porém na literatura não há dados referentes ao papel destes receptores frente a um tratamento intra-cerebral. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel dos receptores de serotonina de tipo 5-HT₇ do NMnR em animais previamente expostos ao estresse de restrição e testados no labirinto em cruz elevado (LCE) 24 horas depois. Para tanto, ratos com cânulas-guia direcionadas ao NMnR foram submetidos a restrição forçada aguda de duas horas e 24 horas depois receberam injeções intracerebrais no NMnR de salina, LP44 e SB258741 (agonista e antagonista de 5HT₇, respectivamente), de forma a compor os seguintes grupos: salina+salina, salina+LP-44, SB-258741+salina e SB-258741+LP-44. Imediatamente após as injeções, os animais foram submetidos ao teste no LCE, tendo seus comportamentos filmados para posterior análise comportamental. Por fim, foi realizada a perfusão transcardíaca seguida da análise histológica dos sítios de injeção. No grupo controle, os animais apenas receberam os tratamentos intracerebrais e foram testados no LCE, sem exposição prévia a restrição. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma e de duas vias, considerando-se os fatores tratamento e condição experimental. Os resultados obtidos mostram que um tratamento com agonista intra-NMnR leva a uma atenuação dos efeitos comportamentais induzidos pelo estresse de restrição. Por outro lado, o tratamento prévio com o antagonista foi capaz de bloquear esses efeitos.

Lista de ilustrações

Figura 1: Labirinto em Cruz Elevado	21
Figura 2: Sítios de injeção confirmados para o Núcleo Mediano da Rafe	27
Figura 3: Ausência de efeito do LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT ₇ , respectivamente), administrados no Núcleo Mediano da Rafe de ratos, sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado na ausência de um evento estressor prévio	29
Figura 4: Efeito do LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT ₇ , respectivamente), administrados no Núcleo Mediano da Rafe de ratos, sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado 24h após um evento estressor (restrição forçada)	31
Figura 5: Efeito da administração de LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT ₇ , respectivamente), no Núcleo Mediano da Rafe de ratos, sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado na ausência de um evento estressor prévio (estresse de restrição), sendo esta a condição controle	33
Figura 6: Esquema representativo da circuitaria glutamatérgica e serotoninérgica no NMnR, NDR e no Hipocampo, envolvendo a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT ₇ e NMDA	38

Lista de tabelas

- Tabela 1:** Divisão dos sete grupos experimentais da curva dose-resposta de LP-44 e SB-258741 de acordo com o tratamento recebido **23**
- Tabela 2:** Divisão dos quatro tratamentos experimentais da condição de evocação da memória aversiva em ratos previamente estressados **25**

Sumário

Introdução	09
Objetivos	18
Materiaise Métodos	19
1. Animais	19
2. Equipamentos utilizados	19
3. Procedimentos experimentais e estudos comportamentais	22
3.1. Efeitos de diferentes doses de LP-44 ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste no LCE	22
3.2. Efeito da administração intra-NMnR de LP-44 e/ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos previamente estressados e submetidos ao teste no LCE	25
3.3. Efeito da administração intra-NMnR de LP-44 e/ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos testados no LCE	26
Resultados	27
Discussão	34
Conclusão	39
Referências Bibliográficas	40

Introdução

O termo depressão é utilizado tanto para se referir a um estado afetivo natural, como por exemplo, a tristeza, quanto para designar uma síndrome, um sintoma ou uma doença. A depressão pode surgir em diversos quadros clínicos, dentre os quais podemos destacar o estresse pós-traumático, o alcoolismo e a esquizofrenia (PORTO DEL, 1999).

Enquanto sintoma, a depressão pode surgir em diversos quadros clínicos, como o estresse pós-traumático, a esquizofrenia e o alcoolismo, além de ocorrer também como uma resposta a situações estressantes. Enquanto síndrome, a depressão altera não somente o humor, mas também inclui alterações cognitivas, psicomotoras e vegetativas. Por fim, enquanto doença, a depressão tem sido classificada de várias formas, dentre as quais podemos destacar o transtorno depressivo maior (TDM), a melancolia, a depressão integrante do transtorno bipolar tipos I e II (PORTO DEL, 1999). A depressão também pode ser uma manifestação de doenças físicas, ou um efeito colateral do uso de drogas e medicamentos, dessa forma, quando não é possível detectar a natureza do transtorno ou que esta não seja evidente (ausência de um estressor, perdas, luto e problemas interpessoais), exames físicos e laboratoriais devem ser realizados para descartar condições físicas ou medicamentosas. Neste caso, a eliminação dos fatores de causa pode resultar no desaparecimento dos sintomas da depressão (GREVET; CORDIOLI; FLECK, 2005).

A maior parte das pesquisas clínicas disponíveis atualmente utiliza o Manual Estatístico dos Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM*), elaborado pela *American Psychiatric Association (APA)*, que define a forma mais comum da síndrome da depressão como sendo o transtorno depressivo maior (TDM). O conceito de depressão maior foi introduzido inicialmente há cerca de 30 anos no DSM-III (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-III*). Os critérios subsequentes de depressão maior, presentes no DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*), diferem ligeiramente dos presentes no DSM-III, sendo os critérios muito abrangentes e, dessa forma, pouco precisos (PARKER; BROTHIE, 2009). De acordo com o DSM-IV, para que o TDM seja diagnosticado é necessário que esteja presente, diariamente, por pelo menos duas semanas consecutivas, no mínimo dois dos seguintes sintomas: desinteresse e desprazer pela maioria das atividades cotidianas, significativos

ganho ou perda de peso, juntamente com aumento ou perda de apetite, agitação ou lentidão psicomotora, fadiga ou perda de energia, sentimentos de culpa excessivos, dificuldade de concentração mental, pensamentos recorrentes sobre morte ou tentativa de suicídio, humor deprimido na maior parte do dia (em crianças e adolescentes o humor pode ser irritável, ao invés de triste) insônia ou excesso de sono e, por fim, de acordo com Del Porto (1999), a redução do interesse sexual também pode servir como parte do diagnóstico do TDM.

A Organização Mundial de Saúde estima que, em 2020, a depressão será a segunda maior questão de saúde pública e incapacidade que acometerá a população mundial e que haverá uma mudança nas necessidades de saúde da população devido ao fato de que doenças como a depressão, e outros distúrbios psiquiátricos, estão substituindo com rapidez os problemas causados por doenças infecciosas e desnutrição (WHO, 2012). De acordo com o Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (março de 2012) a depressão é um problema de saúde pública que, anualmente, acarreta gastos econômicos estimados em 83 bilhões de dólares nos Estados Unidos e de 118 bilhões de euros na Europa, uma vez que os pacientes deprimidos apresentam limitações de suas atividades cotidianas, buscando, assim, serviços de saúde pública com maior frequência. Ainda de acordo com o Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologia em Saúde (março de 2012), em uma amostra realizada na cidade de São Paulo (SP), em 2003, foi estimada que 12,6% da população apresentavam quadros de depressão; em Porto Alegre (RS) esse número foi em torno dos 12,4% e no Distrito Federal (DF) foi de 11,9%. Segundo o DSM-IV, o TDM é duas vezes mais frequente em mulheres adolescentes e adultas do que em adolescentes e adultos do sexo masculino. Além disso, Fleck e cols. (2009) mostraram que a reincidência de episódios de depressão é de aproximadamente 80% ao longo da vida.

A depressão pode apresentar diversas causas. Quando nos referimos ao fator genético, um dos principais problemas para o estudo da depressão é que, em geral, necessita-se de famílias grandes com muitos casos da doença (LAFER; FILHO, 1999). De acordo com o DSM-IV, a incidência de TDM entre parentes biológicos de primeiro grau chega a ser até três vezes maior, quando comparada com a população em geral. Além disso, um estudo feito por Kendler e colaboradores (1995) mostrou que em indivíduos com alto risco genético de depressão (aqueles em que um irmão já desenvolveu o transtorno depressivo)

as chances de se desenvolver o TDM chegam a ser até 2,6 vezes maior, quando comparados com indivíduos de baixo risco genético de depressão (aqueles nos quais o irmão nunca havia sido portador da doença). Por fim, indivíduos com um maior risco genético para desenvolver a depressão são mais sensíveis a eventos estressantes ambientais.

Nos últimos 30 anos a neuroquímica foi a área de maior destaque nas pesquisas que investigaram a fisiopatologia dos transtornos de humor, como a depressão, levando ao estabelecimento de hipóteses fisiopatológicas para o TDM, com a alteração de múltiplos sistemas de neurotransmissão e adaptações moleculares aos antidepressivos (LAFER; FILHO, 1999).

As principais teorias relativas à base biológica da depressão envolvem estudos relacionados aos neurotransmissores cerebrais e seus receptores, porém existem outras teorias sendo investigadas. A principal hipótese que envolve neurotransmissores cerebrais é relacionada às monoaminas (BAHLS, 1999). As monoaminas subdividem-se em duas categorias: as catecolaminas e indolaminas. A categoria das catecolaminas é composta pela dopamina (DA), noradrenalina (NA) e adrenalina (AD), já a categoria das indolaminas inclui a serotonina (5-HT) e a histamina (ALVARENGA, 2007; GOLAN et al., 2009). A hipótese de que as monoaminas estão relacionadas com a depressão se baseia na deficiência das aminas biogênicas, particularmente NA, DA, e 5-HT em pacientes depressivos (ABBAS et al., 2009). Além disso, o atual conhecimento da complexa relação entre os sistemas de neurotransmissores cerebrais trouxe para o foco dos estudos neurobiológicos da depressão os receptores dos neurotransmissores. O interesse a respeito da importância dos receptores deriva dos seguintes achados: a depleção de monoaminas provoca aumento do número de receptores pós-sinápticos (*up-regulation*); em estudos pós-morte em cérebros de pacientes suicidas foi observado um aumento no número de receptores de serotonina de tipo 5-HT_{2c} no córtex frontal (BAHLS, 1999).

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

primeiramente da enzima triptofano hidroxilase (TPH) e posteriormente da enzima 5-Hidroxitriptofano descarboxilase. A síntese desse neurotransmissor pode ser controlada pela quantidade de triptofano presente no fluido extracelular dos neurônios serotoninérgicos, mas como o triptofano é um aminoácido adquirido na dieta, uma alimentação pobre em triptofano pode causar uma diminuição nos níveis de 5-HT. Por outro lado, a degradação da 5-HT se dá, principalmente, pela enzima monoaminoxidase (MAO), que regula os níveis de 5-HT nos tecidos neurais. Uma vez na sinapse, a serotonina pode interagir com receptores pré e pós-sinápticos. Além da interação com os receptores pré-sinápticos, a 5-HT também pode sofrer recaptação, um processo de extrema importância no controle da viabilidade da 5-HT na fenda sináptica e também sensível a ação de alguns fármacos (SCHENKEL, 2011). A recaptação é realizada por proteínas de transporte que se ligam à 5-HT liberada na fenda sináptica e a transportam através da membrana plasmática do neurônio pré-sináptico (SGHENDO; MIFSUD, 2012).

Disfunções no sistema serotoninérgico são associadas a diversos transtornos, como o TDM (SARGENT et al., 2000). Dessa forma, o tratamento crônico com drogas antidepressivas aumenta a disposição de 5-HT na fenda sináptica e a taxa de neurotransmissão serotoninérgica (SCHENKEL, 2011).

Até os anos 80, havia apenas duas classes de antidepressivos, os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAO). O mecanismo de ação dos ADT consiste na redução da recaptação de 5-HT e NA através do bloqueio dos seus respectivos transportadores de recaptação presentes na fenda sináptica, aumentando, assim, a disponibilidade desses dois neurotransmissores na fenda sináptica. Já os IMAO atuam inibindo a degradação de 5-HT realizada pelas MAO. Apesar de serem muito eficazes, esses medicamentos apresentavam efeitos colaterais indesejáveis devido à baixa seletividade farmacológica e se houvesse a administração em altas doses poderiam ser letais (MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, 1999, GOLAN et al., 2009).

Nas últimas duas décadas, novas classes de antidepressivos surgiram, sendo que estas apresentam menos efeitos colaterais em comparação aos ADT, além de maior seletividade farmacológica (MORENO, R.; MORENO, D.; SOARES, 1999). No final da década de 80, o tratamento da depressão foi revolucionado com a introdução dos Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS). Os ISRS estão, atualmente, entre as drogas

mais prescritas para o tratamento da depressão e de outros transtornos psicológicos, como a ansiedade, a esquizofrenia e o transtorno do pânico (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008). A recaptção de um neurotransmissor reduz o seu nível na fenda sináptica mais rapidamente do que a difusão, dessa forma, limita os efeitos dos neurotransmissores liberados na sinapse (SGHENDO; MIFSUD, 2012), assim, ao inibir a recaptção de 5-HT para o neurônio pré-sináptico, os ISRS aumentam os níveis de 5-HT na fenda sináptica. Seu mecanismo de ação é semelhante ao dos ADT, porém são muito mais seletivos para os transportadores de 5-HT e, por isso, apresentam menos efeitos adversos (GOLAN et al., 2009; DOZE; PEREZ, 2012).

Foram identificados quatorze subtipos de receptores de 5-HT, estes receptores estão agrupados em sete famílias, sendo todos eles receptores acoplados a uma proteína-G, exceto o receptor 5-HT₃ que é um canal iônico (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008). O receptor 5-HT₇ é o mais recente identificado, descoberto em 1993, é um receptor pós-sináptico com sete domínios transmembrânicos, acoplado a uma proteína-G que, a partir de um segundo mensageiro, leva à formação de adenil ciclase, ou simplesmente cAMP (BONAVENTURE et al., 2011). No encéfalo, os receptores 5-HT₇ estão distribuídos no córtex, tálamo e núcleos da rafe, principalmente no NMnR, além do hipocampo, uma estrutura relacionada com a aprendizagem e memória (BONAVENTURE et al., 2011).

Vem sendo estabelecida a relação direta do receptor 5-HT₇ com três fenômenos fisiológicos intimamente relacionados: os ritmos circadianos, o sono e o humor (HEDLUND, 2009). Além disso, pesquisas recentes sugerem que este receptor esteja relacionado com a depressão, fazendo com que ele ganhe cada vez mais atenção (HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004; MNIE-FILALI et al., 2011), uma vez que vários antidepressivos e antipsicóticos já conhecidos bloqueiam os 5-HT₇ (HEDLUND, 2009, SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2010, STAHL, 2010, ROBERTS; HEDLUND, 2012).

Além da importância do sistema serotoninérgico, outro fator que também tem sido associado à etiologia da depressão é o estresse, de forma que, cerca de 60% dos casos de depressão são precedidos por eventos ou fatores estressantes. Em 1936, o fisiologista canadense Hans Selye, introduziu o termo “*stress*” no campo da saúde para designar a resposta geral e inespecífica do organismo a uma situação estressante. O estresse provém do estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e geram

diversas alterações, dentre as quais, podemos destacar a perturbação da homeostasia, fazendo com que se inicie um processo de adaptação. A resposta ao estressor compreende aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, visando propiciar uma melhor percepção da situação e um processamento mais rápido da informação disponível, possibilitando a busca por soluções a partir de condutas rápidas e vigorosas. Posteriormente, o termo passou a designar, também, a situação que desencadeia o evento estressante. Se analisarmos do ponto de vista evolutivo, o estresse está ligado a situações de defesa dos animais, assim como o medo e a ansiedade. Dessa forma, diferentes estruturas cerebrais, assim como diferentes mecanismos neurais e endócrinos, estão envolvidos na resposta ao estresse que, por sua vez, varia dependendo do nível e da forma de ameaça (MARGIS et al., 2003).

Nesse sentido, foram estabelecidos três eixos de resposta fisiológica ao estresse. O eixo neural se ativa imediatamente, frente a uma situação de estresse. O eixo neuroendócrino tem sua ativação mais lenta, necessitando de condições de estresse mais duradouras. O eixo endócrino se caracteriza por um disparo mais lento e por efeitos mais duradouros que os anteriores, além disso, as condições de estresse devem ser mantidas por ainda mais tempo (MARGIS et al., 2003).

Evidências da literatura reforçam o papel do estresse na gênese da depressão, uma vez que a neurotransmissão serotoninérgica é sensível ao estresse, dessa forma, a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica causada por eventos estressores, como a imobilização forçada, diminui a adaptação a estes eventos e predispõe o desenvolvimento da depressão (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Estressores induzem o aumento da secreção de glicocorticóides, como a corticosterona em roedores e o cortisol em humanos, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O sistema serotoninérgico está presente na modulação dos efeitos dos glicocorticóides em transtornos do humor, dessa forma, alterações sobre a ação da neurotransmissão serotoninérgica sobre o eixo HPA podem ser vistas como contribuições para as alterações endócrinas observadas na depressão (SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2010). Esta hipótese é reforçada pela observação de que o sucesso do tratamento da depressão com antidepressivos serotoninérgicos não só melhora os sintomas depressivos, mas também restaura os níveis normais de glicocorticóides.

Vários estudos na última década mostraram que os receptores 5-HT₇ hipocampais estão intimamente e complexamente envolvidos com o eixo HPA-serotoninérgico, de forma que, estudos comportamentais, utilizando o modelo de estresse por imobilização, tem mostrado um aumento tanto em níveis de glicocorticóides, quanto na expressão de RNAm para receptores 5-HT₇ no hipocampo. Essa relação do eixo HPA-serotoninérgico liga o estresse, os glicocorticóides e os receptores 5-HT₇ do hipocampo, sugerindo que modulações nesses receptores podem produzir efeitos antidepressivos (NANDAM; JHAVERI; BARTLETT, 2007; BONAVENTURE et al., 2011).

O Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) e o Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) contém corpos celulares da maior parte dos neurônios serotoninérgicos que inervam o prosencéfalo (CALIZO et al., 2011). Deakin e Graeff (1991) sugeriram que projeções serotoninérgicas que partem do Núcleo Mediano da Rafe (NMnR) em direção ao hipocampo, uma estrutura rica em receptores de 5-HT, seriam as responsáveis pela adaptação ao estresse repetido. Porém, o prejuízo da neurotransmissão serotoninérgica hipocampal, causado por eventos estressores crônicos, dificultaria a adaptação a esse estresse e predisporia o desenvolvimento da depressão (DEAKIN; GRAEFF, 1991). A hipótese de Deakin e Graeff foi reforçada com os experimentos realizados por Kennett e cols. (1985a; 1987), os quais mostraram que a exposição ao estresse de restrição inescapável levava a uma diminuição da atividade exploratória de um campo aberto 24 horas depois. Esta diminuição era atenuada quando os animais eram tratados com o 8-OH-DPAT, um agonista de receptores de tipo 5-HT_{1A}, e desaparecia quando os animais eram repetidamente expostos à restrição. Reforçando o papel da serotonina, o tratamento crônico com 5-MeDMT, um agonista de receptores de serotonina de tipo 5-HT₁, simultaneamente ao estresse de restrição repetido induziu sinais da chamada Síndrome Serotoninérgica, sugerindo que a adaptação ao estresse estaria acompanhada de um fortalecimento da neurotransmissão mediada por 5-HT₁. Entretanto, os sítios cerebrais envolvidos na mediação desses efeitos não foram investigados.

Posteriormente, vários trabalhos na literatura mostraram que o Hipocampo Dorsal estaria envolvido na mediação de parte desses efeitos. Nesse sentido, a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica (PADOVAN; GUIMARÃES, 1993) mediada por 5-HT_{1A} no

hipocampo (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003) ou no NMnR (NETTO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2013) é capaz de atenuar os efeitos da exposição a estressores inescapáveis.

Vários modelos animais têm sido usados na investigação de hipóteses e de fármacos relacionados à depressão, principalmente em roedores. Os principais modelos animais que envolvem a exposição a estressores inescapáveis são: o desamparo aprendido (proposto por Seligman em 1975), o nado forçado (proposto por Porsolt e colaboradores em 1977), a restrição forçada seguida pelo teste no labirinto em cruz elevado (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000) ou campo aberto (KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985a). O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos de ansiedade mais utilizados em todo o mundo. O LCE é composto por quatro braços elevados, aproximadamente 50 cm do chão e opostos, dois destes braços apresentam paredes e, por isso, são denominados de braços fechados, enquanto que os outros dois braços não possuem paredes e são chamados de braços abertos. O uso do LCE se baseia no conflito gerado pela tendência natural de roedores em explorar locais novos e evitar situações potencialmente perigosas (INeC), ou seja, este comportamento é atribuído à aversão natural dos ratos pelos braços abertos. Também é assumido que os níveis de exploração exibidos por um animal no LCE é resultado de uma “competição” entre dois sistemas: um sistema exploratório que promove respostas investigatórias e um sistema de medo e ansiedade que inibe a exploração. Um princípio muito importante é o de que estes dois sistemas funcionam independentemente entre eles, dessa forma, um aumento na atividade exploratória pode ser resultado tanto da redução do sistema de medo e ansiedade quanto do aumento do sistema exploratório (WEISS et al., 1998).

Apesar de ser um dos modelos animais para o estudo dos transtornos de ansiedade, o LCE é uma excelente ferramenta para avaliar os efeitos comportamentais da exposição a eventos estressores incontroláveis, já que a pré-exposição a estressores incontroláveis pode intensificar a aversão ocasionada pela exposição aos braços abertos do LCE. Dessa forma, a utilização conjunta do teste de restrição forçada e do LCE se mostra um excelente modelo animal para o estudo da depressão (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000).

Vários trabalhos já foram realizados com a administração de agonistas e antagonistas de 5-HT₇ em diferentes modelos. Redução do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda foi observada após tratamento com antagonistas de 5-HT₇ (ABBAS et al., 2009;

SARKISYAN; ROBERTES; HEDLUND, 2010). Utilizando o teste do nado forçado, Mnie-Filali e colaboradores (2011) mostraram uma redução do tempo de imobilidade. Outros trabalhos mostraram que um tratamento realizado com agonista de 5-HT₇ facilitou a formação de novas memórias em ratos (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008; BONAVENTURE et al., 2011). Além disso, Bonaventure e colaboradores (2011), observaram que durante o tempo de consolidação da memória, a expressão de RNAm de 5-HT₇ mostrou-se mais elevada. Estes resultados sugerem que o bloqueio dos receptores 5-HT₇ pode ter atividade antidepressiva também em humanos, uma vez que poderiam bloquear a formação de novas memórias relacionadas aos eventos aversivos.

Dados anteriores de nosso laboratório (Almeida e colaboradores, 2013) mostram que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no NMnR é capaz de atenuar os efeitos do estresse de nado forçado. Entretanto, esses efeitos não foram totalmente bloqueados pelo tratamento prévio com WAY100635, um antagonista seletivo de 5-HT_{1A} (FORSTER et al., 1995). Embora o 8-OH-DPAT tenha sido descrito inicialmente como agonista de 5-HT_{1A} (ADELL et al., 1993, BOSKER et al., 1994, ADELL; ARTIGAS, 1998), este composto também apresenta afinidade por 5-HT₇ (BARD et al., 1993, LOVENBERG et al., 1993, RUAT et al., 1993, THOMAS et al., 1998, HOYER et al., 2002), sugerindo que os receptores de serotonina de tipo 5-HT₇ do NMnR estejam envolvidos na adaptação ao estresse de nado forçado.

Dessa maneira, considerando-se as evidências anteriormente apresentadas, a hipótese de nosso trabalho é a de que a adaptação ao estresse envolve a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por 5-HT₇ no NMnR.

Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi investigar o papel dos receptores de 5-HT de tipo 5-HT₇ do Núcleo Mediano da Rafe na resposta ao estresse de restrição por imobilização forçada.

Especificamente, os objetivos foram:

- Realizar uma curva dose-resposta para o agonista (LP-44) e o antagonista (SB-258741) de 5-HT₇ administrados no NMnR;
- Investigar se o tratamento intra-NMnR com LP-44 e/ou SB-258741, induz alteração na atividade exploratória no LCE 24 horas depois de um evento estressor incontrolável (restrição forçada).

Materiais e Métodos

1. Animais:

Foram utilizados 99 ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo do Campus Ribeirão Preto, com aproximadamente sete semanas de idade e peso entre 300 e 350g. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório por dois dias para ambientação, sendo colocados aos pares em caixas de acrílico (35 x 19 x 25 cm) forradas com serragem e livre acesso à água e comida. O biotério foi mantido em ciclo claro-escuro de doze horas (início do período claro às 6:30 am). A temperatura ambiente do biotério foi mantida em 23 +/-1°C.

Este projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP – campus Ribeirão Preto e aprovado no protocolado 2014.1.231.53.9. É importante destacar que os procedimentos adotados neste projeto já foram anteriormente aprovados por essa comissão em outros processos (06.1.1131.53.0; 12.1.354.53.1).

2. Equipamentos utilizados:

Para a cirurgia estereotáxica:

- Aparelhos estereotáxicos (Stoelting);
- Cânulas guia de aço inox (14 mm) com um nó de fio metálico soldado a 4 mm de uma das pontas para facilitar a fixação da cânula ao capacete de acrílico;
- Cimento acrílico de uso odontológico para moldagem da prótese utilizada para proteção do crânio e fixação da cânula guia;
- Pequenos parafusos (usados em armação de óculos) para auxiliar na fixação do acrílico;
- Mandris de aço inox (14 mm) para impedir o entupimento da luz da cânula e evitar o contato do tecido vivo com o meio externo;
- Instrumentos cirúrgicos (pinça, tesoura, bisturi e espátula);
- Mini-retífica para perfuração óssea (Dremel);

- Anestésico geral 2, 2, 2-tribromoetanol a 2,5% (Sigma-Aldrich, 250mg/kg, a 10ml/kg; i.p.) diluído em água destilada;
- Solução hidroalcoólica de iodo 2% para limpeza e desinfecção da região da cirurgia e dos pontos de injeção;
- Anestésico local cloridrato de lidocaína (Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,2mg/ml, a 0,2ml/animal; s.c.) associado a vasoconstritor noradrenalina 0,04%;
- Anti-inflamatório, analgésico e antitérmico flunixinina meglumina, 5mg/ml (Banamine Injetável; Schering-Plough; 2,5mg/kg, a 1ml/kg de peso corporal; s.c.);
- Associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fort Dodge, 240.000 UI; 0,2ml/animal; i.m.) diluída em água destilada.

No procedimento de restrição forçada:

- Gaiolas de aço inox (20 cm x 6,5 cm), com teto removível e ajustável.

Para os experimentos:

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

As doses que foram utilizadas tanto do agonista, quanto do antagonista de 5-HT₇, foram definidas em estudo piloto através da curva dose-resposta para cada um dos fármacos, e foram baseadas em dados da literatura (MONTI et al., 2008), de modo que as doses utilizadas na curva dose-resposta para o agonista (LP-44) foram 0,1; 0,3 e 1,0 nmol/0,2μL, enquanto que para o antagonista (SB-258741) foram 0,03; 0,1 e 0,3 nmol/0,2μL.

Para o teste do labirinto em cruz elevado LCE:

- Um LCE elevado 50 cm do solo (figura1);
- Uma câmera filmadora, acima do LCE que filma o comportamento do animal e transmite a informação gravada para um computador para registro das imagens para análise posterior.

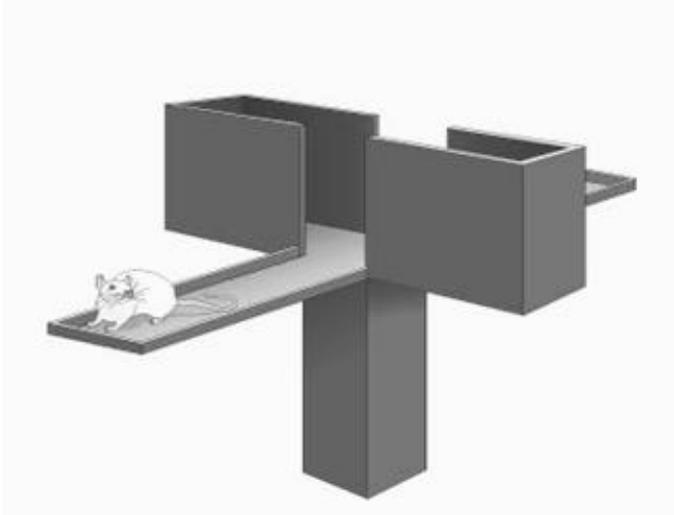


Figura 1: Labirinto em Cruz Elevado.

Para o procedimento de perfusão:

- Tubos de látex com 5 mm de espessura para a montagem do sistema de perfusão; agulhas de injeção ligadas ao tubo de látex para injeção das soluções no organismo do animal;
- Bomba peristáltica para a infusão (Sibralab);
- Guilhotina (Bonter Equipamentos) para a retirada da cabeça do animal;
- Instrumentos cirúrgicos;
- Uretana 25% (Sigma-Aldrich, 1,25g/kg, a 10ml/kg; i.p.) diluída em água destilada como anestésico;
- Solução salina 0,9%;
- Solução de formaldeído a 4%.

Para a preparação do material histológico:

- Aparelho criostato (Leica, modelo Cryocut 1.800) para preparação dos cortes histológicos;
- Lâminas (Precision Glass Line 26,0 x 76,0 mm) e lamínulas (Kinttel-Glass);
- Microscópios (Leica DM5500 e Zeiss JENAMED 2) para análise do sítio de injeção dos cortes histológicos.

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

3. Procedimentos experimentais e estudos comportamentais

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

3.1. Efeitos de diferentes doses de LP-44 ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste no LCE

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

uma incisão longitudinal, expondo o crânio e removendo o periósteo por raspagem. Com a mini-retífica, foram abertos três orifícios no crânio, sendo um deles para a incisão da cânula, através da qual a agulha será direcionada para a injeção intracerebral no NMnR, de acordo com as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (1997) (ântero-posterior: -7,3; lateralidade: 2,7; profundidade: -7,8; inclinação da haste: 18º). Os outros dois orifícios foram utilizados para a implantação de dois parafusos que auxiliam na fixação da prótese de acrílico. Após o término da cirurgia, os animais permaneceram em um ambiente aquecido até retomarem os sentidos. Depois, foram levados ao biotério em suas respectivas caixas para que se recuperarem durante o período de uma semana com livre acesso à água e comida.

Após o período de recuperação, os animais foram divididos em seis grupos, de acordo com o fármaco e com a dose deste que receberam, além de um grupo controle tratado apenas com salina, como apresentado na tabela a seguir.

Tabela 1: divisão dos sete grupos experimentais da curva dose-resposta de LP-44 e SB-258741 de acordo com o tratamento recebido.

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

Os animais foram, então, submetidos ao teste no LCE. Imediatamente antes do teste, os animais receberam duas injeções intracerebrais. Para a administração intra-NMnR dos fármacos e salina foi utilizada uma bomba de infusão (KdScientific, EUA), na qual seringas de Hamilton de 10µl, foram conectadas a tubos de polietileno (PE 10) com agulhas gengivais de 13 mm. A velocidade da injeção foi programada para 0,4 µL/ minuto.

As injeções intracerebrais foram de Salina (0,2µL), LP-44 (0,3 nmol/0,2µL) e/ou SB-258741 (0,1 nmol/,2µL), com um intervalo de cinco minutos entre cada injeção e cinco

minutos após a segunda injeção os animais foram submetidos ao teste no LCE. Os animais foram colocados no aparato do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e tiveram seus comportamentos registrados durante cinco minutos por meio de um sistema de vídeo acoplado a um computador.

Terminado o teste no LCE, os ratos foram anestesiados com uretana 25% (i.p.) para a realização da perfusão com solução salina 0,9% e solução de formaldeído 10%. Por fim, os animais foram decapitados com a guilhotina para a remoção do encéfalo, sendo tais estruturas mantidas em solução de formaldeído para a realização dos cortes histológicos, em secções de 50 μm , em um criostato e montagem de lâminas para verificação, no microscópio, dos sítios de injeções, uma vez que foram levados em consideração apenas os animais em que o sítio de injeção foi o NMnR.

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

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

e

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

Onde:

FA = frequência de entrada nos braços abertos;

FF = frequência de entrada nos braços fechados;

TA = tempo despendido nos braços abertos;

TF = tempo despendido nos braços fechados.

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

3.2. Efeito da administração intra-NMnR de LP-44 e/ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos previamente estressados e submetidos ao teste no LCE

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, como já descrito anteriormente, e aproximadamente sete dias depois foram realizados os procedimentos experimentais. Inicialmente, os animais foram submetidos ao estresse de restrição. A restrição forçada foi realizada durante duas horas em gaiolas de aço inox (20 cm x 6,5 cm), com teto removível e ajustável que permitia que os animais se movimentassem apenas para frente e para trás. Após este procedimento, os animais foram levados de volta às suas caixas no biotério. Vale ressaltar que, em todos os grupos da condição experimental do estresse de restrição previamente ao teste, a restrição forçada foi realizada sempre no período da manhã.

24 horas depois, os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento que receberiam. Como já descrito, os animais receberam duas injeções intra-NMnR com um intervalo de cinco minutos entre elas e cinco minutos após a segunda injeção foram colocados no LCE e tiveram seus comportamentos filmados para posterior análise histológica. Foram selecionadas as doses intermediárias de ambas as drogas (LP-44 0,3 nmol e SB-258741 0,1 nmol) para dar continuidade aos experimentos.

Os quatro grupos em que os animais foram divididos neste estudo estão representados na tabela 2.

Tabela 2: divisão dos quatro tratamentos experimentais da condição experimental dos animais previamente estressados da memória aversiva em ratos previamente estressados.

	Primeira injeção	Segunda injeção
	salina	Salina
	salina	LP-44 0,3 nmol

Tratamento	SB-258741 0,1 nmol	Salina
	SB-258741 0,1 nmol	LP-44 0,3 nmol

Terminado o teste no LCE, os animais foram submetidos à perfusão e tiveram seus encéfalos removidos para análise histológica do sítio de injeção intracerebral.

3.2. Efeito da administração intra-NMnR de LP-44 e/ou SB-258741 sobre o comportamento exploratório de ratos testados no LCE (condição controle)

A condição controle foi realizada com animais não expostos ao estresse de restrição. Vale ressaltar que, a fim de minimizar o número de animais utilizados nos experimentos, no estudo desta condição experimental foram utilizados os dados da curva dose-resposta para três dos quatro grupos, desta condição. Como os procedimentos adotados nestas duas condições são os mesmos, os dados referentes ao grupo controle (Salina+Salina), ao grupo tratado apenas com agonista de 5-HT₇, LP-44 (Salina+LP-44), e ao grupo tratado apenas com o antagonista de 5-HT₇, SB-25-8741 (SB-258741+Salina) foram reutilizados dos dados da curva dose-resposta, sendo realizados novos experimentos apenas para acrescentar o grupo tratado com ambas as drogas (SB-258741+LP-44). Lembrando que os dados reutilizados são referentes às doses selecionadas de cada droga, 0,3 nmol para o LP-44 e 0,1 nmol para o SB-258741. Os tratamentos experimentais desta condição controle são os mesmos do estudo anterior e estão representados na tabela 2.

Para esse estudo, após a transformação dos dados obtidos em porcentagens como descrito no estudo 1, os resultados foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida por Análise Discriminativa. Os fatores considerados foram condição experimental (com e sem estresse prévio) e tratamento intracerebral. O nível de significância estabelecido é de 0,05.

Resultados

Os resultados dos experimentos estão apresentados nas figuras de 2 a 5.

A figura 2 representa os sítios de injeções confirmados para o NMnR. Desta forma, ratos que não tiveram o sítio de injeção confirmado não foram considerados na análise estatística. Deve-se destacar que não houve alteração dos planos de coordenadas utilizadas para atingir o NMnR.

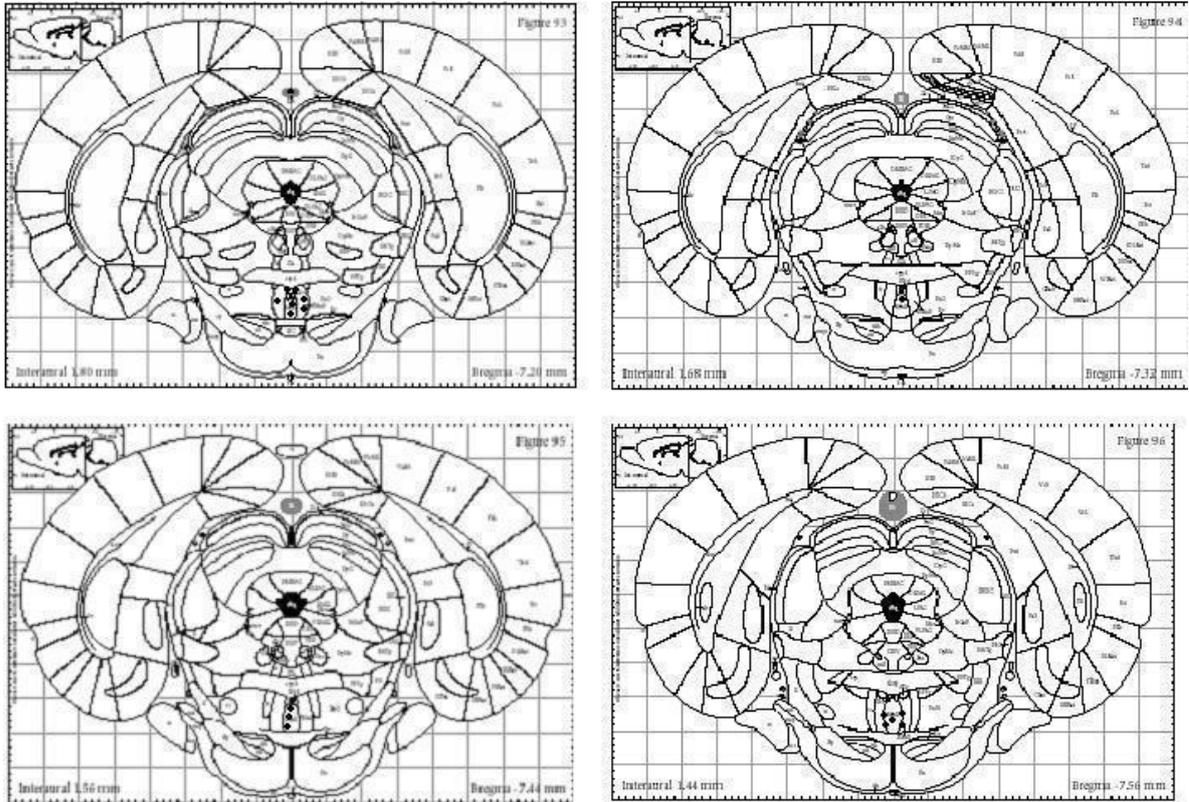


Figura 2: Sítios de injeção confirmados para o Núcleo Mediano da Rafe. As pranchas contendo representações esquemáticas de cortes coronais do cérebro de ratos foram retiradas do atlas de Paxinos e Watson (1986). O número de pontos indicados nas pranchas é menor que o número de animais, devido à sobreposição de pontos.

Nas figuras 3, 4 e 5, estão representadas as médias +erro padrão da média (EPM) da frequência de entradas nos braços fechados (FF - painel superior), da porcentagem da frequência de entradas nos braços abertos (%FA - painel inferior, barras brancas) e da porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%TA - painel inferior, barras pretas) em relação ao total.

A figura 3 mostra os resultados obtidos na curva dose-resposta das drogas utilizadas. Não foram encontradas diferenças significativas após o tratamento com as diferentes doses de SB-258741 e/ou LP-44 administrados no NMnR em ratos.

Especificamente, na FF ($F_{7,65}=0,82$; $p>0,05$) não houve alteração com nenhuma das diferentes doses desses compostos nas entradas dos braços fechados, quando comparadas com o grupo controle. Da mesma forma, as análises da atividade exploratória dos braços abertos, FA ($F_{7,65}=0,28$; $p>0,05$) e TA ($F_{7,65}=0,68$; $p>0,05$) também não indicaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Os resultados do teste no LCE estão representados nos dois painéis da figura 3.

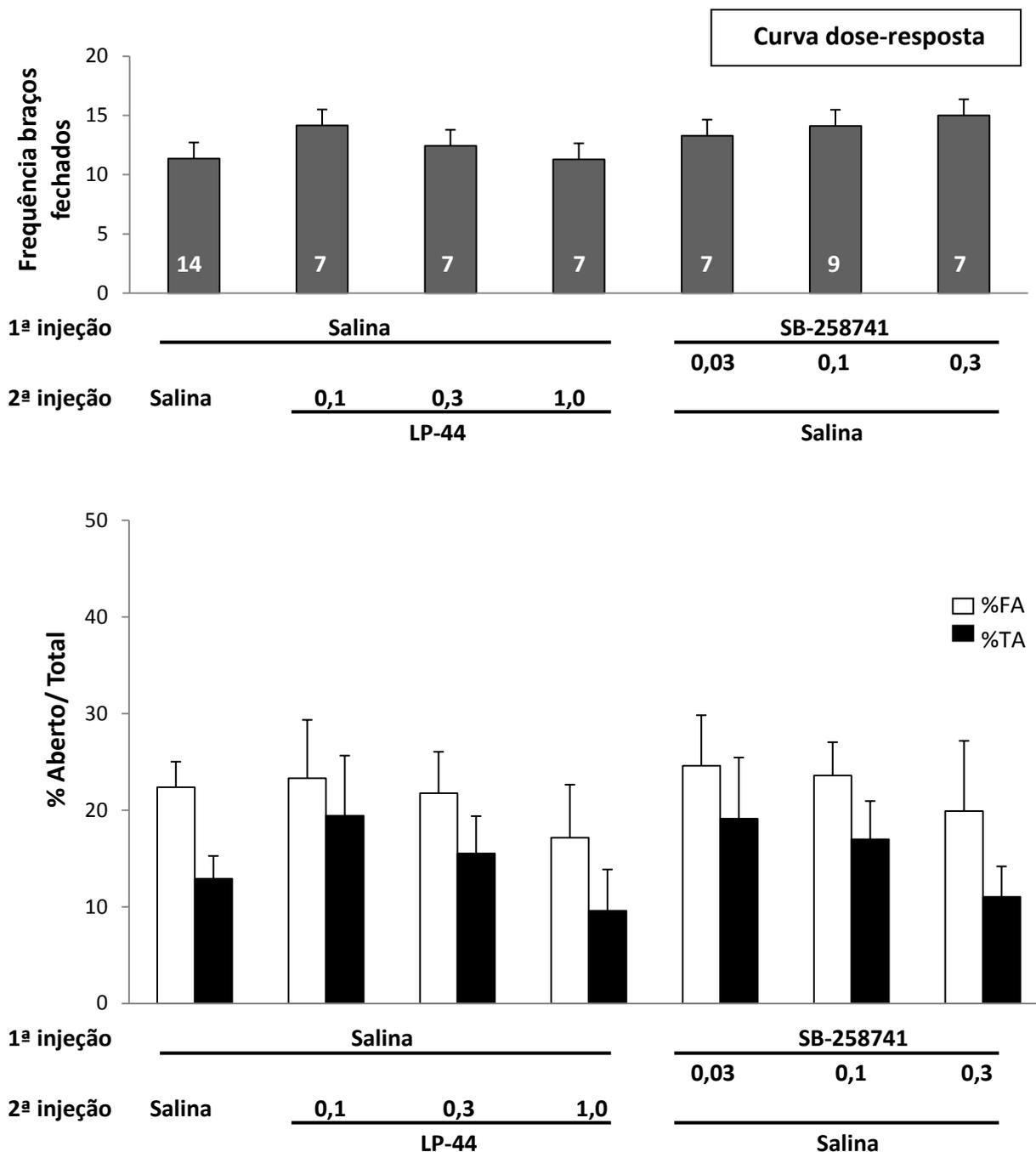


Figura 3: Ausência de efeito do LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT₇, respectivamente), administrados no Núcleo Mediano da Rafe de ratos, sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado na ausência de um evento estressor prévio. No painel superior são apresentadas as médias + EPM (erro padrão das médias) das frequências de entradas nos braços fechados (FF; barras cinzas) dos diferentes grupos experimentais. No painel inferior estão representadas as médias + EPM das porcentagens de entrada (%FA; barras brancas) e tempo (%TA; barras pretas) nos braços abertos em relação ao total. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, em relação ao controle (salina+salina) (ANOVA de uma via seguida de Duncan). Os números apresentados nas barras indicam o número de animais por grupo.

A figura 4 mostra as médias+EPM dos animais que foram expostos ao estresse de restrição e que receberam o tratamento intra-NMnR e foram testados no LCE 24 horas depois (Restrição → Injeção + LCE).

A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,35}=2,66$; $0,05 < p < 0,10$) quanto ao número de entradas nos braços fechados (FF). No entanto, embora os níveis de significância não tenham sido atingidos, há uma tendência à diferença ($0,05 < p < 0,10$), apresentada pelo grupo Salina+LP-44. O grupo tratado com Salina+LP-44 ($7,88 \pm 1,17$) apresentou uma menor FF em comparação ao grupo controle, tratado com Salina + Salina ($12,73 \pm 1,51$). O tratamento com SB-25741+Salina ($13,22 \pm 1,68$); não alterou a exploração dos braços fechados em relação ao controle, assim como o grupo tratado com SB-258741+LP-44 ($11,12 \pm 0,89$).

A ANOVA também não mostrou diferença significativa entre os grupos quanto à porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{3,35}=4,57$; $0,05 < p < 0,10$). Porém, assim como para a FF, o grupo tratado com Salina+LP-44 ($42,57 \pm 5,71$) apresentou uma %FA bem maior quando comparado ao controle Salina+Salina ($15,68 \pm 4,60$). O tratamento com SB-258741+Salina ($17,39 \pm 4,27$) ou com SB-258741+LP-44 ($26,64 \pm 4,19$) não alterou a exploração dos braços abertos em relação ao grupo controle.

Com relação à porcentagem do tempo despendido nos braços abertos, a ANOVA não indicou diferenças significativas ($F_{3,35}=1,02$; $p > 0,05$) entre os grupos (Salina+LP44= $27,71 \pm 7,23$; SB258741+Salina= $14,00 \pm 3,43$; SB258741+LP44= $18,31 \pm 4,65$) quando comparados ao controle (Salina+Salina= $10,96 \pm 3,77$).

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

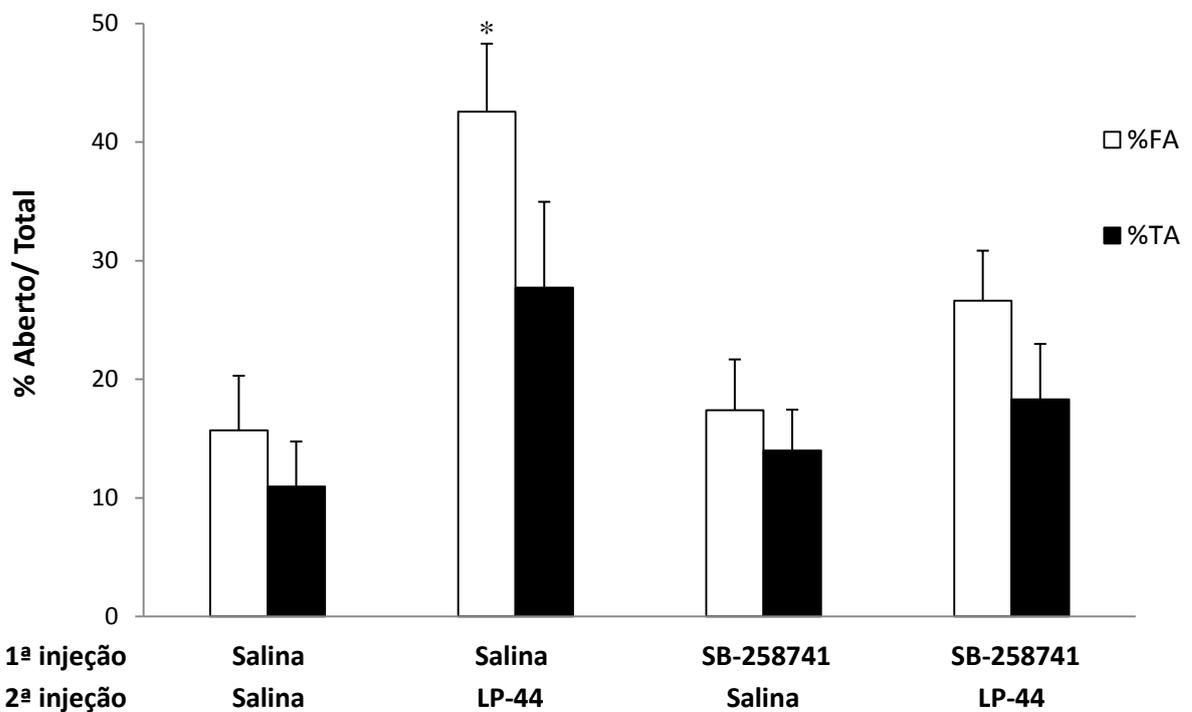
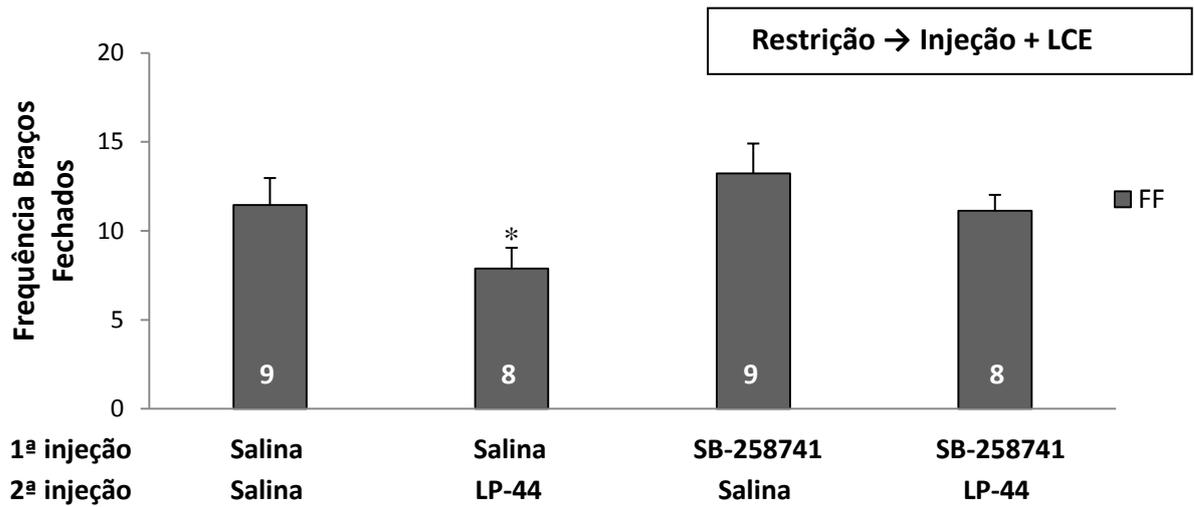


Figura 4: Efeito do LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT₇, respectivamente), administrados no Núcleo Mediano da Rafe de ratos, sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado 24h após um evento estressor (restrição forçada). No painel superior são apresentadas as médias + EPM (erro padrão das médias) das frequências de entradas nos braços fechados (FF; barras cinzas) dos diferentes grupos experimentais. No painel inferior estão representadas as médias +EPM das porcentagens de entrada (%FA; barras brancas) e tempo (%TA; barras pretas) nos braços abertos em relação ao total. (ANOVA de uma via seguida de Duncan). O asterisco indica diferença significativa em relação ao controle. Os números apresentados nas barras indicam o número de animais por grupo.

A figura 5 mostra os resultados do experimento no qual os animais não estressados receberam os diferentes tratamentos intra-NMnR antes do teste no LCE.

Quanto ao número de entradas nos braços fechados ($F_{3,37}=0,97$; $p>0,05$), a ANOVA de uma via não indicou diferença significativa entre os grupos (Salina+LP-44=12,43±1,06; SB-25741+Salina=14,11±1,90; SB-258741+LP44=11,00±1,35) em relação ao controle (Salina+Salina=11,35±1,10).

Com relação à porcentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA não indicou diferença ($F_{3,37}=3,36$; $p>0,05$) entre os grupos. Da mesma forma, a ANOVA não indicou nenhuma diferença significativa com relação à porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{3,37}=0,18$; $p>0,05$) entre os grupos (Salina+LP-44=21,77±4,26; SB-258741+Salina=23,58±3,44; SB-258741+LP-44=25,93±6,46) quando comparados ao grupo controle (Salina+Salina=22,36±2,64). A ANOVA também não apresentou diferenças significativas na porcentagem de tempo despendido nos braços abertos ($F_{3,37}=0,34$; $p>0,05$) entre os grupos (Salina+LP-44=15,52±3,85; SB-258741+Salina=16,98±3,94; SB-258741+LP-44=16,48±4,42) em relação ao grupo controle (Salina+Salina=12,90±2,35).

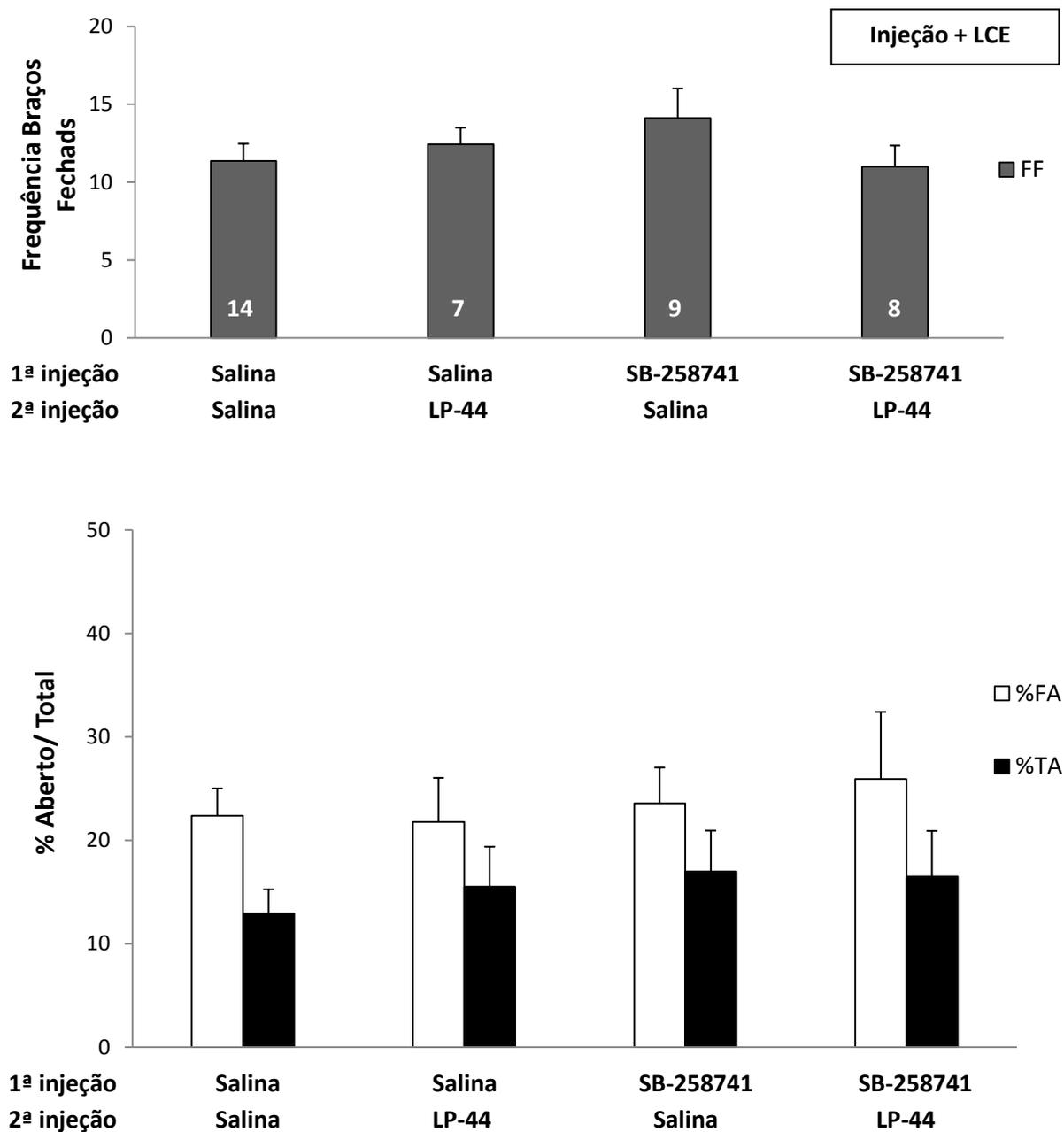


Figura 5: Efeito da administração de LP-44 e do SB-258741 (agonista e antagonista de 5-HT₇, respectivamente), no Núcleo Mediano da Rafe de ratos, sobre a atividade exploratória no labirinto em cruz elevado na ausência de um evento estressor prévio (estresse de restrição), sendo esta a condição controle. No painel superior estão apresentadas as médias + EPM (erro padrão das médias) das frequências de entradas nos braços fechados (FF; barras cinzas) dos diferentes grupos experimentais. No painel inferior estão representadas as médias + EPM das porcentagens de entrada (%FA; barras brancas) e tempo (%TA; barras pretas) nos braços abertos em relação ao total. (ANOVA de uma via seguida de Duncan). Os números apresentados nas barras indicam o número de animais por grupo.

Discussão

Diferentes modelos animais podem ser utilizados na investigação dos efeitos gerados por um fármaco no organismo e/ou dos substratos neurais envolvidos (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998). O LCE é um modelo animal muito utilizado e validado para o estudo da ansiedade. O LCE é um aparato de madeira, constituído por dois braços fechados e dois braços abertos de mesmas dimensões (50x10 cm), que se cruzam perpendicularmente, 50 cm acima do nível do solo, havendo uma plataforma central (10x10 cm). Os braços abertos são cercados por uma barreira de *plexiglass*, de 1 cm de altura, para evitar possíveis quedas dos animais, enquanto que os braços fechados são circundados por paredes de 40 cm de altura (PELLOW et al., 1985). Pellow e cols. (1985) validaram as medidas clássicas para verificar o nível de ansiedade no LCE, através da análise dos comportamentos dos ratos, levando-se em conta o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nos braços.

O LCE pode ser utilizado como ferramenta para avaliar os efeitos comportamentais da exposição a eventos estressores incontroláveis, como o estresse de restrição, uma vez que a pré-exposição a estressores incontroláveis pode intensificar a aversão ocasionada pela exposição aos braços abertos do LCE, quando o teste é realizado 24 h. ou 48h. após a restrição forçada (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). Assim, a utilização em conjunto do teste de restrição forçada e do LCE se mostra um excelente modelo animal para o estudo da depressão (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000).

No modelo do LCE, é assumido que, de forma geral, as drogas que induzem uma maior exploração dos braços abertos e ao mesmo tempo não afetam a atividade locomotora do animal, apresentam um efeito ansiolítico, de forma que as drogas que fazem com que o animal explore mais os braços fechados, também sem alterar sua atividade locomotora, apresentam efeito ansiogênico (WEISS et al., 1998).

No encéfalo os receptores 5-HT₇ estão distribuídos no córtex, tálamo e núcleos da rafe, principalmente no NMnR, além do hipocampo (BONAVENTURE et al., 2011). O receptor 5-HT₇ participa da modulação de processos fisiológicos como ansiedade, sono, aprendizagem e memória e respostas cardiovasculares (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008). Além disso, sabe-se também que este receptor tem um importante papel na adaptação ao

estresse, uma vez que, após um evento de estresse agudo foi encontrada uma elevada quantidade de RNAm para 5-HT₇ no hipocampo de ratos (CIFARIELLO; POMPILI; GASBARRI, 2008).

A literatura ainda é bastante escassa quanto aos efeitos de fármacos que atuam sobre 5-HT₇ quando administrados em estruturas cerebrais específicas, sendo, portanto, este um trabalho pioneiro no estudo deste receptor intra-NMnR, porém há evidências sobre os efeitos antidepressivos do tratamento com antagonistas de 5-HT₇ na adaptação a eventos estressores, quando administrados periféricamente (HEDLUND, 2009, SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2010, STAHL, 2010, ROBERTS; HEDLUND, 2012). Mnie-Filali et al. (2011) realizaram um estudo para saber se a administração de um antagonista de 5-HT₇ (SB-269970, 0,5 mg/Kg, i.p.) teria efeitos sobre a atividade locomotora de ratos submetidos ao teste do nado forçado. Nesse trabalho, não foi encontrada nenhuma alteração nesta atividade, apesar de se observar que o tratamento com o antagonista reduziu o tempo de imobilidade neste teste, sugerindo um perfil antidepressivo pelo bloqueio de 5-HT₇. Da mesma forma, Wesolowska et al. (2006) também realizam um estudo com antagonista de 5-HT₇ com diversos modelos animais. Nesse sentido, os pesquisadores buscaram averiguar se o antagonista utilizado (SB-269970 1, 5, 10 e 20 mg/Kg) teria alguma influência sobre a atividade locomotora, o que não foi observado.

Com base nos resultados encontrados na literatura, podemos afirmar que os dados obtidos neste trabalho com a curva dose-resposta do SB-258741 estão de acordo com a literatura, apesar de não haver informações sobre administração intracerebral de antagonistas de 5-HT₇. Assim como o SB-258741, o LP-44 também não apresentou efeito sobre a atividade exploratória dos animais.

Dessa maneira, considerando-se que não foram observadas alterações da atividade exploratória no LCE com nenhuma das doses dos fármacos, foram selecionadas as doses intermediárias de ambas as drogas para dar continuidade aos estudos, sendo estas 0,1 nmol do SB-258741 e 0,3 nmol do LP-44.

Ao analisarmos os resultados referentes aos animais submetidos ao estresse e tratados com o agonista LP-44 foi observada uma atenuação dos efeitos comportamentais induzidos pelo estresse de restrição em comparação ao grupo controle Salina+Salina. Por outro lado, Eriksson et al. (2012) realizaram um estudo com administração intraperitoneal

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

Embora esses resultados pareçam contraditórios aos dados da literatura, uma possível explicação envolve a via de administração utilizada. A maioria dos trabalhos na literatura utilizou a via intraperitoneal (i.p.), enquanto que em nosso estudo, a administração foi realizada diretamente no NMnR. Nesse sentido, a administração periférica (por via i.p.) faz com que o fármaco seja amplamente distribuído, exercendo sua ação por diferentes estruturas cerebrais onde estejam localizados os 5-HT₇. Por outro lado, ao administrar os fármacos intra-NMnR, os efeitos resultantes referem-se à participação direta desta estrutura nas respostas comportamentais ao estresse. O efeito antidepressivo observado com o LP-44 pode ser explicado considerando-se que a via NMnR-Hipocampo é inibitória e o receptor 5-HT₇ está acoplado a uma proteína Gs. Dessa maneira, a ação de um agonista de 5-HT₇ no NMnR faz com que esta via se mantenha ativa, inibindo o hipocampo em decorrência da liberação de serotonina nessa última estrutura, uma vez que os receptores 5-HT_{1A} estão associados a uma proteína Gi e estão amplamente presentes no hipocampo. Assim, uma vez que o hipocampo tem sido apontado como responsável pela formação de novas memórias, como a referente ao estresse de restrição, sua inibição levaria a uma interrupção na formação da memória aversiva, o que seria expresso como uma atenuação dos efeitos comportamentais do estresse. Tal explicação encontra suporte parcial no trabalho realizado por Mnie-Filali et al. (2011), os quais observaram efeito antidepressivo no teste do nado forçado em animais que receberam tratamento com SB-269970 diretamente no Hipocampo.

Já os resultados obtidos com o tratamento com SB-258741, mostraram que este fármaco não alterou o comportamento dos animais previamente estressados. Uma vez que a via NMnR-Hipocampo é inibitória, o bloqueio da mesma faz com que o NMnR deixe de inibir o hipocampo, pois, uma vez bloqueada, a via não libera 5-HT no hipocampo, dessa

forma, os receptores de serotonina de tipo 5-HT_{1A} ali presentes não são ativados e, portanto, não geram uma resposta de atenuação dos efeitos comportamentais induzidos pelo estresse de restrição. Além disso, quando administrado previamente ao LP-44, o SB-258741 foi capaz de antagonizar os efeitos do agonista de 5-HT₇.

Ao analisarmos os resultados dos estudos com os animais não estressados (condição controle), a análise estatística não evidenciou diferenças significativas entre os grupos, dessa forma, há uma corroboração mútua com os resultados obtidos na curva dose-resposta, uma vez que os procedimentos experimentais da curva dose-resposta e da condição controle são os mesmos.

Além da participação do sistema serotoninérgico mediada pelos receptores 5-HT₇, é possível que o sistema glutamatérgico também esteja envolvido na mediação das consequências comportamentais do estresse, interagindo com o sistema serotoninérgico (TAO; AUERBACH, 2003). De acordo com Calizo e cols. (2011), a rafe como um todo apresenta neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos, de forma que os neurônios não-serotoninérgicos estão presentes em quantidades iguais ou maiores aos serotoninérgicos no NMnR e no NDR (CALIZO et al., 2011). Os neurônios glutamatérgicos estão intermisturados e co-localizados com neurônios serotoninérgicos por todas as áreas da rafe, tais co-localizações também estão presentes em regiões terminais, como o córtex e o hipocampo. No entanto, no NMnR e no NDR, os neurônios glutamatérgicos e serotoninérgicos estão presentes em quantidades muito elevadas, quando comparados aos demais sítios da rafe (CALIZO et al., 2011).

Dados da literatura sugerem que os receptores 5-HT₇ do NMnR estão localizados em neurônios não-serotoninérgicos dessa estrutura, especificamente em neurônios glutamatérgicos. Outras duas evidências importantes são que o NMnR recebe projeções glutamatérgicas do NDR e que a estimulação de receptores de glutamato de tipo NMDA presentes no NMnR leva a um aumento nas concentrações extracelulares de 5-HT tanto no próprio NMnR quanto no Hipocampo (TAO; AUERBACH, 2003). Em conjunto, esses dados sugerem que o NMnR apresenta uma circuitaria envolvendo os sistemas serotoninérgico e glutamatérgico. Nesse sentido, é possível que a estimulação dos receptores 5-HT₇ localizados nos interneurônios glutamatérgicos do NMnR, ou seja, nos neurônios não serotoninérgicos, aumente a liberação de serotonina, a qual, por sua vez, atuará sobre os

receptores de tipo 5-HT_{1A} dos neurônios de projeção ao hipocampo dorsal, levando à inibição das memórias aversivas relacionadas ao estresse. Com isso, ocorreria adaptação frente ao evento aversivo.

Na figura 6 pode-se observar um esquema referente à circuitaria proposta.

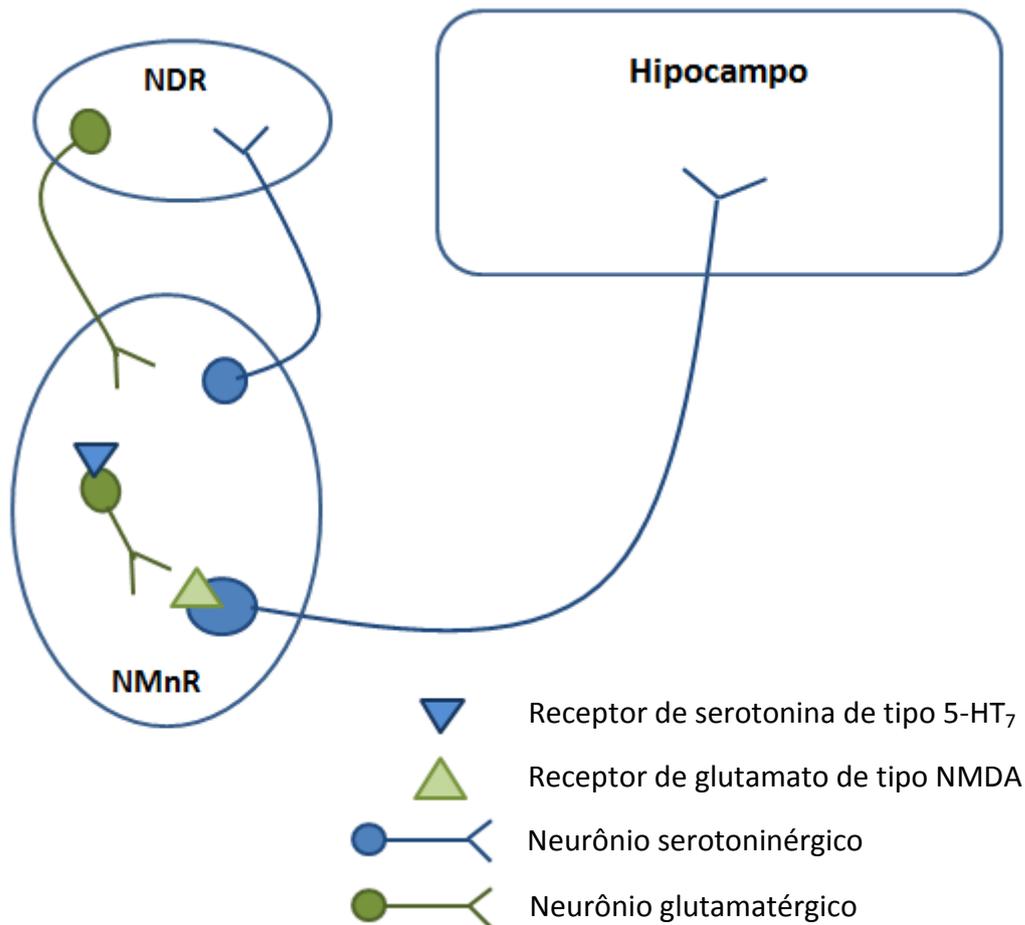


Figura 6: esquema representativo da circuitaria glutamatérgica e serotoninérgica no NMnR, NDR e no Hipocampo, envolvendo a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT₇ e NMDA.

No entanto, vários estudos ainda são necessários a fim de confirmar a existência de tal circuitaria, como por exemplo, estudos envolvendo eletrofisiologia.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que a administração de um agonista de 5-HT₇ diretamente no NMnR leva a uma atenuação das respostas comportamentais induzidas pela exposição a um estressor inescapável/incontrolável, o que está de acordo com os resultados presentes na literatura (HEDLUND, 2009; SARKISYAN; ROBERTS; HEDLUND, 2010; STAHL, 2010; MNIE-FILALI et al., 2011; ROBERTS; HEDLUND, 2012).

Referências Bibliográficas Seleccionadas

ALMEIDA, P.V.G.; TROVO, M.C.; TOKUMOTO, A.M.; PEREIRA, A.C.; PADOVAN, C.M. Role of 5-HT_{1A} Receptors in the Median Raphe Nucleus on the behavioural consequences of Forced Swim Stress. **Journal of Psychopharmacology**. 2013.

ABBAS, A. I.; HEDLUND, P. B.; HUANG, X.-P. et al. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 119–128, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HUNZIKER, M. H. L. Learned Helplessness Revisited: Animal Studies. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 21, n. 2, p. 131–139, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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**. 26(10):1085-1089, 1993.

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

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

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

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

PELLOW, S.; SHOPIM, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

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

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

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

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

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

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

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

World Health Organization. Disponível em:

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