



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

ALDO FONSECA DE SOUZA

Investigação do papel de receptores do tipo 5-HT₇ da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade

**NATAL - RN
2015**

ALDO FONSECA DE SOUZA

Investigação do papel de receptores do tipo 5-HT₇ da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional.

Área de concentração: Neurofarmacologia, Psicofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa de Paula Soares Rachetti

NATAL - RN
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biotecnologias

Souza, Aldo Fonseca de.

Investigação do papel de receptores do tipo 5-HT₇ da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade / Aldo Fonseca de Souza. – Natal, RN, 2015.

95 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa de Paula Soares Rachetti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

1. Ansiedade. – Dissertação. 2. Labirinto em cruz elevado. – Dissertação. 3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal. – Dissertação. I. Rachetti, Vanessa de Paula Soares. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.89-008.441

Nome: SOUZA, Aldo Fonseca de

Título: Investigação do papel de receptores do tipo 5-HT₇ da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional.

Área de concentração: Neurofarmacologia, Psicofarmacologia.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vanessa de Paula Soares Rachetti
Departamento de Biofísica e Farmacologia, Centro de Biociências - UFRN
Presidente

Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina Gavioli
Departamento de Biofísica e Farmacologia, Centro de Biociências - UFRN
Examinadora Interna

Prof^a. Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli
Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas - UFPR
Examinadora Externa

NATAL / RN
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

À Profa. Dra. Vanessa de Paula Soares
Rachetti, pelo carinho, orientação e
atenção constantes.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

A todos quanto acreditam que um dia
seus esforços valerão a pena...

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha existência e principal fonte de todas as minhas inspirações. Por Seu inexplicável amor. Pelo privilégio de estudar a vida e suas manifestações. Pela certeza de estar comigo sempre, apesar das minhas falhas. Por me conceder Sua graça todos os dias e, assim, me ensinando a retirar forças em meios às fraquezas, me ajudando a perseverar até o fim.

Aos meus queridos e amados pais. Por sempre me compreenderem nos momentos que me ausentava bastante de casa em virtude dos estudos e da pesquisa, principalmente nos feriados. Este mérito também é vosso.

Aos queridos irmãos da Igreja Evangélica Assembleia de Deus congregação Boa Esperança, pelas orações a Deus em prol da minha vida.

À Karla Juliete, minha querida noiva. Pela paciência e compreensão que teve comigo especialmente durante este período do mestrado. Te amo!

À minha querida orientadora e mãe científica, Prof^a. Dr^a. Vanessa de Paula Soares Rachetti, de admirável sabedoria. Um verdadeiro exemplo de profissional. Pelo seu carinho. Por ter me aceitado em seu laboratório. Por ter acreditado e confiado em mim. Pelos tão valiosos conselhos e orientações que tornaram possíveis a pesquisa e elaboração dessa dissertação. Pela paciência em me nortear no que eu deveria fazer e por ter me feito acreditar no potencial de ter autonomia científica. Muito dos conhecimentos que acumulei acerca da ciência da Farmacologia, devo isso à senhora. Que Deus continue a abençoando e iluminando!

À Prof^a. Dr^a. Elaine Gavioli, também um grande exemplo de profissional. Por ter me aceitado inicialmente como seu orientando, quando a Professora Vanessa não pode me assumir. Por ter me aceitado como seu aluno de docência assistida, que, diga-se de passagem, foi uma ótima experiência! Também pela paciência em separar um horário para mim na sua sala a fim de sanar algumas das minhas dúvidas ao longo do meu mestrado. E por, gentilmente, ter assumido o papel de presidente na banca de qualificação quando a Professora Vanessa precisou ausenta-ser por um tempo. Que Deus continue iluminando todos os seus caminhos!

À Professora Doutora Janaina Menezes Zanoveli da UFPR, que juntamente com a Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina Gavioli, gentilmente aceitaram o convite de participar como membros da minha banca examinadora, contribuindo assim para o enriquecimento deste trabalho.

Aos queridos professores do Departamento de Morfologia (DMOR) da UFRN. Por cada palavra de ânimo. Por cada correção. Por alimentarem a certeza de que no “fazer ciência”, não estamos sós. Foi graças a seus ensinamentos que hoje posso aplicar o que aprendi, e, assim, tornar-me um bom profissional desse ramo tão maravilhoso da biologia, que é a Morfologia. Meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Judney Cley Cavalcante, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, por sempre está nos atualizando acerca das atividades e eventos do Programa, e, também à Prof^a Dra. Alianda Cornélio, ambos do DMOR, que juntos aceitaram o convite em fazer parte da minha banca de qualificação, e, assim, terem contribuído substancialmente com suas valiosas e construtivas sugestões no que precisava melhorar em relação à minha dissertação. Meu muito obrigado!

Por todos meus colegas da Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional. Pelos momentos que estudamos juntos, pelo companheirismo e amizade de vocês. Que Deus abençoe a todos!

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia I e II, meus queridos Flávio, Carla e César. Foi na convivência e rotina da pesquisa que nos tornamos amigos. Vocês foram muito importantes durante essa minha jornada. Sem medir esforços, sempre nos ajudando no que diz respeito ao biotério, nos procedimentos envolvendo o preparado das drogas e na providência dos materiais necessários para a nossa pesquisa. Meu muito obrigado! Que Deus continue vos abençoando!

Ao professores Luciano de Souza Queiroz e Maria Júlia Marques, ambos do Instituto de Biologia da Unicamp, por gentilmente terem nos dado a permissão de utilizar a imagem do mesencéfalo do seu site didático de neuroanatomia para ilustrar a substância cinzenta periaquedutal. Meu muito obrigado!

Aos funcionários da SAFE, em especial o senhor Erinaldo (Naldo) e seu ajudante Taironis, eletricitas da UFRN. Por sempre atenderem nosso chamado

quando alguma coisa relativa à parte elétrica precisava de atenção, bem como ao senhor Nilson, por sempre nos ajudar na limpeza do biotério e o senhor Raimundo, por nos auxiliar na limpeza de alguma sala no prédio de cima ou na providência de algum material para a pesquisa. Que Deus continue vos abençoando!

Aos colegas da base de pesquisa e do Laboratório de Farmacologia Comportamental (FarmaCoLab), em especial minhas queridas Ana, Alana, Jarmilla, Bárbara e Carolina. A amizade e o companheirismo de vocês foram indispensáveis no sucesso desse trabalho. Muito obrigado!

À minha nobre amiga Betsaida, pela amizade, apoio e palavras de fé durante minha fase final do mestrado. Que Deus continue te abençoando!

Ao pessoal do Laboratório de Estudos da Memória (LEME), em especial ao Ramón e Luís por sempre poderem agendar para nós o criostato, cedendo dessa forma tempo e espaço para podermos fazer nossos cortes histológicos, bem como o preparo das nossas lâminas. Que Deus continue vos abençoando!

À minha querida prima, técnica e bióloga Raquel, e ao Prof. Tarcísio, ambos da Universidade Potiguar, por suas contribuições na etapa final desse trabalho. Muito obrigado!

Aos animais (*in memoriam*), sem os quais obviamente não teria sido realizada essa pesquisa. Aprendemos ver vocês com outros olhos, diferente daqueles com os quais estávamos acostumados. Trabalhar com vocês foi de certa forma, assumir o risco de parecer cruéis aos olhos daqueles que estão de fora, porém conscientes de que tudo sempre foi realizado com muito respeito. Não houve um dia sequer da pesquisa que vocês não passassem pelos meus pensamentos. Meu muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsas aos alunos de pós-graduação, que é de fundamental importância para o estímulo e o avanço das pós-graduações no nosso país.

Por fim, a todos que fazem a Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pela eficiência e oportunidade de ter concluído um mestrado acadêmico numa universidade pública de qualidade.

Quem se arrisca a andar por ares nunca antes respirados ou pensar fora da curva tem grandes chances de encontrar pedras no caminho. No entanto, ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônias nesse processo. Não há céu sem tempestade. Risos e lágrimas, sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas idéias.

Augusto Cury

O trabalho experimental dessa pesquisa de mestrado foi realizado no Laboratório de Farmacologia Comportamental e nas dependências do Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia do Centro de Biociências/UFRN.

RESUMO

SOUZA, A. F. **Investigação do papel de receptores do tipo 5-HT₇ da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2015.

A ansiedade, embora conceituada como um sentimento vago e desagradável de medo e apreensão derivados de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho, é também caracterizada como um estado emocional de grande valor adaptativo e importante para a sobrevivência, uma vez que nos adverte do perigo, ativando a resposta de luta ou fuga, o que nos permite lidar com a emergência. Dentre os sistemas de neurotransmissão envolvidos na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade, o sistema serotoninérgico tem sido amplamente estudado. Considerando a presença do receptor de serotonina do tipo 7 (5-HT₇) na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPD), uma estrutura bastante implicada nos comportamentos defensivos, o presente estudo verificou se a manipulação farmacológica do receptor 5-HT₇ alteraria as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos. Ratos Wistar (90 ± 5 dias) foram submetidos a dois protocolos experimentais. No experimento 1, ratos submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânula-guia receberam a administração intra- SCPD de veículo (Salina + DMSO) ou do agonista de receptores 5-HT₇ AS-19 nas doses de 0,05, 0,1 e 0,2 µg. Cinco minutos após a administração, os animais foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE). Vinte e quatro horas depois, estes mesmos animais passaram pelo teste do campo aberto. Já no experimento 2, os animais receberam a infusão do antagonista de receptor 5-HT₇ SB-269970 (5, 10 ou 20 nmol) ou veículo seguida de administração intra-SCPD do agonista AS-19 (0,1 µg) ou veículo previamente aos testes comportamentais. Os resultados mostraram que, quando administrado isoladamente, o agonista AS-19 na dose de 0,1 µg, mas não nas doses de 0,05 e 0,2 µg, diminuiu a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE, sugerindo efeito do tipo ansiogênico. A administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 na dose de 10 nmol promoveu efeito do tipo ansiolítico, quando observado o aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. Este efeito foi revertido pela administração do agonista AS-19 na dose de 0,1 µg. Nenhuma das drogas testadas alterou parâmetros de locomoção analisados no teste do campo aberto, sugerindo que os efeitos relacionados à ansiedade não estejam associados a alterações na locomoção dos animais. Os dados aqui obtidos permitem a conclusão de que receptores do tipo 5-HT₇ da SCPD, quando ativados, modulam um efeito do tipo ansiogênico. Ainda, o bloqueio de receptores 5-HT₇ nesta área favorece um efeito do tipo ansiolítico, que vem sendo descrito na literatura após a administração periférica de antagonistas destes receptores.

Palavras-chave: Ansiedade, receptor 5-HT₇, labirinto em cruz elevado, substância cinzenta periaquedutal dorsal

ABSTRACT

SOUZA, A. F. **Investigation of the role of 5-HT₇ receptors of dorsal periaqueductal gray in modulating on anxiety-like behavior.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2015.

Anxiety, although conceptualized as a vague, unpleasant feeling of fear of unknown, is also characterized as an emotional state of great adaptive value and it is important for survival. Among the neurotransmitter systems involved in the expression of anxiety-related behaviors, the serotonergic system has been widely studied. Considering the presence of subtype 7 serotonin receptor (5-HT₇) in the dorsal portion of the periaqueductal gray (DPAG), a brain area involved in defensive behaviors, this study aimed to investigate if the pharmacological manipulation of the 5-HT₇ receptor could alter anxiety-related behaviors in rats. Wistar rats (90 ± 5 days) were submitted to two experimental protocols. In experiment 1, rats were submitted to stereotactic surgery and received intra-DPAG administration of vehicle (Saline + DMSO) or 5-HT₇ receptors agonist AS-19 at doses of 0.05, 0.1 and 0.2 µg. Five minutes after administration, the animals were tested in the elevated plus maze (EPM). Twenty-four hours later, the same animals were submitted to the open field test. In experiment 2, the animals received an infusion of 5-HT₇ receptors antagonist SB 269970 (5, 10, or 20 nmol) or vehicle followed by intra-DPAG administration of AS-19 (0.1 µg) or vehicle prior to behavioral testing. The results showed that, when administered alone, AS-19 at a dose of 0.1 µg, but not of 0.05 and 0.2 µg, decreased the percentage of entries and time spent on the open arms of the EPM, suggesting an anxiogenic-like effect. Intra-DPAG administration of SB 269970 at dose of 10 nmols promoted an anxiolytic-like effect, when observed an increase in the percentage of time spent in the open arms of the EPM. This effect was reversed by the administration of AS-19 at a dose of 0.1 µg. None of the drugs altered the locomotion of animals in the open field test, suggesting that their effects on anxiety responses have not being related to locomotor activity changes. The data here obtained suggest that 5-HT₇ receptors subtype in the DPAG, when activated, modulate an anxiogenic-like effect. Moreover, the blockade of 5-HT₇ receptors in this area favors an anxiolytic-like effect. This effect has been described in literature after peripheral administration of 5-HT₇ receptors antagonists.

Keywords: Anxiety, receptor 5-HT₇, elevated plus maze, periaqueductal gray.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama representando o Sistema Encefálico Aversivo. Os mecanismos associados à resposta de medo estão associados ao sistema de luta/fuga ou sistema cerebral de defesa. A estimulação química ou elétrica de determinadas estruturas cerebrais localizadas mais rostralmente como a amígdala ou o hipotálamo medial, produzem um padrão típico de respostas de medo, que são acompanhadas de uma atividade motora intensa, assim como de reações neurovegetativas, dentre as quais o aumento na pressão arterial e alterações na frequência cardíaca, respiração, analgesia e imobilidade, semelhantes àquelas evocadas quando o animal é confrontado com estímulos aversivos ou dolorosos em situação natural, e que são permanentemente suprimidos após lesão na substância cinzenta periaquedutal (Brandão et al., 2003, 2008; Vianna; Brandão, 2003). Esquema adaptado de Graeff e Guimarães (2005). 26

Figura 2. Corte coronal a nível do mesencéfalo do cérebro humano mostrando a substância cinzenta periaquedutal. Imagem retirada do site didático do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (Unicamp). (Imagem usada com permissão). Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/neuroanatmesencefalo.html#superior>. Acessado em 06/07/2015 28

Figura 3. Ilustração esquemática das colunas neuronais dorsomedial (dm), dorsolateral (dl), lateral (l) e ventrolateral (vl) das porções rostral, intermediária e caudal da Substância Cinzenta Periaquedutal – SCPD. (Adaptado de Linnman et al., 2012). 28

Figura 4. (A) Estrutura da monoamina serotonina, (5-Hidroxitriptamina – 5-HT) conforme Kitson, (2007) e Gellynck et al., (2013). (B) Vias de distribuição encefálica de serotonina no cérebro humano. Os principais centros de neurônios serotoninérgicos são os núcleos rostral e caudal da rafe. Dos núcleos rostrais da rafe ascendem axônios para o córtex cerebral, regiões límbicas e especificamente para o gânglio basal. Os núcleos serotoninérgicos no tronco encefálico originam axônios descendentes, alguns dos quais terminam na medula espinal. Disponível em: https://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/normalbrain/neuro_path_sn. 31

Figura 5. Representação simplificada da biossíntese da serotonina e seus metabólitos. MAO: monoamina oxidase (Adaptado de Kitson, 2007). 32

Figura 6. Diversidade de receptores da serotonina (5-HTRs) e seus efeitos intracelulares. Os receptores da serotonina são agrupados em sete famílias baseadas nas vias de efeitos intracelulares e na homologia de sequência. Com exceção do receptor 5-HT₃, todas as outras classes de receptores serotoninérgicos

são acopladas à proteína G. Os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ são acoplados à proteína G estimulatória (G_s), que ativa a enzima adenilato ciclase (AC). A adenilato ciclase sintetiza monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) para a produção de adenosina trifosfato (ATP). O cAMP ativa a proteína quinase dependente de cAMP, também conhecida como proteína quinase A (PKA). A PKA fosforiliza proteínas quinases intermediárias (PKs), que modulam a atividade dos canais iônicos, resultando em despolarização do neurônio. Em contraste, receptores 5-HT₁ são acoplados à proteína G inibitória (G_i), que inibe a AC, resultando em hiperpolarização. Receptores 5-HT₂ são acoplados à proteína G quinase (G_q), que ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A PLC cliva fosfolípidos (PL) a diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃). O DAG ativa proteína quinase do tipo C (PKC) que ativa PK a fim de modular os canais de cátions e despolariza o neurônio. IP₃ atua liberando íons Ca²⁺ de estoques intracelulares, contribuindo também para a despolarização. O Ca²⁺ ativa a proteína quinase dependente de calmodulina/Ca²⁺ (CamK), que, juntamente com PKA e PKC, influencia a transcrição através da fosforilação de fatores de transcrição (TFs). Receptores 5-HT₅ foram relatados a acoplar-se negativamente a AC e positivamente aos canais de Ca²⁺ sensíveis à IP₃. Os receptores 5-HT₃ são ligantes não seletivos de canais de cátions que resulta em alta despolarização quando ativados. As linhas sólidas indicam efeitos estimulatórios; linhas tracejadas, efeitos inibitórios. (Adaptado de Lam e Heisler, 2007, tradução nossa). 34

Figura 7. Representação esquemática das vias de sinalização reguladas pelo receptor 5-HT₇. Os efeitos mediados pela proteína G_s são mostradas na seção esquerda. O resumo dos processos de sinalização mediado por G₁₂ é mostrado na seção direita. Abreviações: GIRK – Protína G acoplada em canais de potássio retificadores; AC – Adenilato ciclase; cAMP – monofosfato cíclico de adenosina; PKA – proteína quinase A; ERK – proteínas quinases reguladas por sinal extracelular; Akt – Proteína quinase B; Hsp90 – Proteína de choque térmico 90; ERM – proteínas da família ezrina-radixina-moesina; GEF – Fator de troca guanina nucleotídeo (representada pela RhoGEF, LARG e p155Rho associada à leucemia); nRTKs – não receptor de tirosina quinase; AKAPs – Proteína de ancoragem quinase-A; ZO – Proteína da zona ocludens; SRF – Fator de resposta sérica; SER – elemento de resposta sérica. (Adaptado de Guseva et al., 2014, tradução nossa). 39

Figura 8. Distribuição autorradiográfica de receptores 5-HT₇ no cérebro humano (A e B) e de rato (C e D) através da marcação de sítios pela técnica de *binding* para a [³H]mesulergina. Secções coronais a nível do mesencéfalo. Abreviaturas: substância cinzenta periaquedutal, CG; núcleo dorsal da rafe, DRN; substância nigra, SN; núcleo interpeduncular, IP. Barra: 2mm. (Adaptado de Martín-Cora e Pazos, 2004). 40

Figura 9. Identificação dos locais designados tanto da cânula-guia, como do parafuso auxiliar de ancoragem. O ponto preto indica o orifício craniano para cânula. A estrela de quatro pontas indica o local de fixação do parafuso. Adaptado do Atlas de Paxinos e Watson (1998). 46

Figura 10. Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Trata-se de um aparato de madeira em forma de cruz, elevado 50 cm em relação ao solo, tendo um par de braços opostos abertos e um par de braços opostos fechados lateralmente e perpendicular aos braços abertos. É um método padrão-ouro para avaliação do comportamento do tipo ansioso em roedores (Pires et al., 2012). Acervo pessoal.	49
Figura 11. Campo aberto. (Acervo pessoal)	51
Figura 12. Protocolo experimental do experimento 1.	53
Figura 13. Protocolo experimental do experimento 2.	53
Figura 14. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal de 30 µm do mesencéfalo mostrando o sítio de microinjeção na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (DPAG) de ratos submetidos ao teste do LCE e campo aberto. Lentes objetivas de 4X. (B) Esquema de delimitação da figura A feita de acordo com as coordenadas estereotáxicas para o cérebro de rato do Atlas de Paxinos e Wattson, 1998. Legenda: DMPAG – substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; DLPAG – substância cinzenta periaquedutal dorsolateral; LPAG – substância cinzenta periaquedutal lateral; VLPAG – substância cinzenta periaquedutal ventrolateral; Aq – Aqueduto cerebral.	54
Figura 15. Representação esquemática dos sítios alvo de microinjeção de veículo ou do agonista de receptores 5-HT ₇ , AS-19 nas doses de 0,05, 0,1 ou 0,2 µg na SCPD de ratos submetidos ao protocolo experimental dos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto (n total = 44; n por grupo = 9-15).	55
Figura 16. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT ₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 µg) sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 9-15). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo.	56
Figura 17. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT ₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 µg) sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 9-15). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo.	57
Figura 18. Representação esquemática dos sítios alvo de microinjeção de veículo ou do antagonista de receptores 5-HT ₇ , SB-269970 nas doses de 5, 10 ou 20 nmol, seguida da administração de veículo ou seu agonista, o AS-19 (0,1µg) na SCPD de ratos submetidos ao protocolo experimental dos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto (n total = 70; n por grupo = 7-12).	59

Figura 19. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇ SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 7-12). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo. 60

Figura 20. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇ SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 7-11). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo; #p = 0,002 em relação ao grupo SB269970 10nmols/AS19 0,1 μ g. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 μ g) sobre o número de entradas nos braços fechados, plataforma central e no número de entradas totais, em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 9-15). 57

Tabela 2. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 μ g) sobre as variáveis de atividade locomotora e ansiedade basal de ratos submetidos ao teste do Campo Aberto (n = 9-15). 58

Tabela 3. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇, SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,1 μ g) sobre o número de entradas nos braços fechados, plataforma central e no número de entradas totais, em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 7-12). 62

Tabela 4. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD de veículo ou antagonista de receptor 5-HT₇ SB-269970 (5, 10 e 20 nmol) seguida de administração intra-SCPD de veículo ou do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,1 μ g) sobre os parâmetros de atividade locomotora e ansiedade basal de ratos submetidos ao teste do Campo Aberto (n = 7-12). 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 5ª Edição
- APA – Associação Americana de Psiquiatria
- TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada
- SEA – Sistema Encefálico Aversivo
- SIC – Sistema de Inibição Comportamental
- SHD – Sistema Hipotalâmico de Defesa
- SCP – Substância Cinzenta periaquedutal
- Unicamp – Universidade de Campinas
- SCPDI – Substância Cinzenta periaquedutal dorsolateral
- SCPDm – Substância Cinzenta periaquedutal dorsomedial
- SCPL – Substância Cinzenta periaquedutal lateral
- SCPVI – Substância Cinzenta periaquedutal ventrolateral
- 5-HT – 5-hidroxitriptamina, serotonina
- DRN – Núcleo dorsal da rafe
- DMN – Núcleo mediano da rafe
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
- Gi – Proteína G inibitória
- AC – Adenilato ciclase
- cAMP – monofosfato cíclico de adenosina
- Gs – Proteína G estimulatória
- Gq – Proteína G quinase
- DAG – Diacilglicerol
- IP₃ – trifosfato de inositol
- 5-HT₁ – Receptor serotoninérgico do tipo 1
- 5-HT₄ – Receptor serotoninérgico do tipo 4
- 5-HT₆ – Receptor serotoninérgico do tipo 6
- 5-HT₇ – Receptor serotoninérgico do tipo 7
- 5-HT₂ – Receptor serotoninérgico do tipo 2
- 5-HT₃ – Receptor serotoninérgico do tipo 3
- 5-HT_{3A} – Receptor serotoninérgico do tipo 3, subtipo A

- 5-HT_{3B} – Receptor serotoninérgico do tipo 3, subtipo B
- 5-HT_{3C} – Receptor serotoninérgico do tipo 3, subtipo C
- 5-HT₅ – Receptor serotoninérgico do tipo 5
- 5-HT_{1A} – Receptor serotoninérgico do tipo 1, subtipo A
- 5-HT_{2A/C} – Receptores serotoninérgicos do tipo 2, subtipos A e C
- 8-OH-DPAT – (±)-8-Hidróxi-2-dipropilaminotetralinahidrobromida
- WAY-100635 – *N*-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-*N*-2-piridinilciclohexanocarboxamida maleato
- DOI – 4-Iodo-2,5-dimetoxi- α -metilbenzenoetanamina hidrocloreto
- 5-HT_{2C} – Receptor serotoninérgico do tipo 2, subtipo C
- MK-212 – 6-Cloro-2-(1-piperazinil)pirazine hidrocloreto
- 5-HT_{2B} – Receptor serotoninérgico do tipo 2, subtipos B
- LTE – Labirinto em T elevado
- mCPP – 1-(3-Clorofenil)piperazine hidrocloreto
- SDZ SER 082 – (+)-*cis*-4,5,7a,8,9,10,11,11a-Octahidro-7*H*-10-metilindolo[1,7-*bc*][2,6]-naftiridine fumarato
- RO-600175 – (α S)-6-Cloro-5-fluoro- α -metil-1*H*-indol-1-etanamina fumarato
- SB-242084 – 6-Cloro-2,3-dihidro-5-metil-*N*-[6-[(2-metil-3-piridinil)oxi]-3-piridinil]-1*H*-indol-1-carboxiamida dihidrocloreto
- SCPD – Substância Cinzenta periaquedutal dorsal
- 5-HT_{7A} – Receptor serotoninérgico do tipo 7, subtipo A
- 5-HT_{7B} – Receptor serotoninérgico do tipo 7, subtipo B
- 5-HT_{7C} – Receptor serotoninérgico do tipo 7, subtipo C
- 5-HT_{7D} – Receptor serotoninérgico do tipo 7, subtipo D
- G₁₂ – Proteína G tipo 12
- GTP – guanina trifosfato
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- SNC – Sistema Nervoso Central
- SB-269970 – ((2*R*)-1-[(3-hidroxifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]-pirrolidina)
- 5-HT^{-/-} – Ausência de receptores serotoninérgico do tipo 7 (p. ex. camundongos modificados geneticamente, *knockout*).
- i.p. – intraperitoneal

- AS-19 – ([*(2S)*-(+)-5-(1,3,5-Trimetilpirazol-4-yl)-2-dimetilamina]tetralina]
- UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- CEUA - Comitê de Ética do Uso de Animais
- s.c.. – subcutânea
- i.m. – intramuscular
- DMSO – dimetilsulfóxido
- LCE – labirinto em cruz elevado
- FF – frequência (número de entradas) nos braços fechados
- FA – frequência (número de entradas) nos braços abertos
- FC – frequência (número de entradas) no centro
- TA – tempo no braço aberto
- LP-211 – [*N*-(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinahexanamida]
- LP-378 – agonista de receptores 5-HT₇ com propriedades semelhantes ao LP-211 (nomenclatura química não encontrada)
- LP-44 – {4-[2-(metiltio)fenil]-*N*-(1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenil)-1-piperazinahexanamida}
- LP-12 – 4-(2-Difenil)-*N*-(1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1-il)-1-piperazinahexanamida hidroclorido
- E-55888 – [dimetil-[2-[3-(1,3,5-trimetil-1*H*-pirazol-4-yl)-fenil]-etil]amina]
- 5-HT_{1B} – Receptor serotoninérgico do tipo 1, subtipo B
- 5-HT_{1D} – Receptor serotoninérgico do tipo 1, subtipo D

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

- Ca^{2+} – íon cálcio
- Na^{2+} – íon sódio
- K^{+} – íon potássio
- % - por cento, porcentagem
- Kd – quilodalton
- μg – micrograma
- nmol – nanomol
- cm – centímetro
- ® – marca registrada
- °C – grau Celsius
- mg/kg – miligrama por quilo
- mm – milímetro
- n° – número
- W – watts
- mg/kg/ml – miligrama por quilo por mililitro
- NaCl – cloreto de sódio
- $\mu\text{l}/\text{min}$ – microlitro por minuto
- μl – microlitro
- cm – centímetro
- μm – micrômetro
- α – alfa
- < – menor
- = – igual
- K_i – constante de dissociação
- pKi – forma logarítmica negativa do K_i ($\text{p}K_i = -\log K_i$)
- nM - nanomolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Ansiedade e o Sistema Encefálico Aversivo	22
1.2 A Substância Cinzenta Periaquedutal	27
1.3 A relação serotonina, ansiedade e substância cinzenta periaquedutal	30
1.4 O receptor 5-HT ₇	38
1.4.1 Caracterização e localização	38
1.4.2 O receptor 5-HT ₇ e os estudos de pesquisa básica	41
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Animais	44
3.2 Cirurgia estereotáxica	44
3.3 Habituação	46
3.4 Drogas, tratamentos e administração	46
3.5 Testes Comportamentais	48
3.5.1 Labirinto em Cruz Elevado	48
3.5.2 Campo Aberto	50
3.6 Perfusão	52
3.7 Histologia	52
3.8 Análise Estatística	52
4 RESULTADOS	54
4.1 Experimento 1.....	54
4.1.1 Labirinto em Cruz Elevado	56
4.1.2 Campo Aberto	58
4.2 Experimento 2	58
4.2.1 Labirinto em Cruz Elevado	60
4.2.2 Campo Aberto	63
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8 ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO

Compreender os processos que envolvem a fabulosa maquinaria da mente humana nunca foi uma tarefa fácil de fazer, sobretudo no campo das emoções. Rir, chorar, odiar, amar ou sentir alegria, medo, ansiedade e tristeza, por exemplo, são emoções presentes durante toda nossa vida e é até considerado que a oscilação natural que compreende este espectro emotivo seja evolutivamente benéfica para o organismo poder restabelecer-se frente a eventos inesperados. Logo, não valorizar o significado das emoções seguindo esse ponto de vista evolutivo, é sobremaneira difícil. As questões que ainda permanecem em aberto no universo das emoções e, de maneira especial, na ansiedade, estabelecem um elo principalmente à sua subjetividade e, como consequência dessa subjetividade, o conhecimento das bases biológicas das emoções consideradas normais, bem como de suas patologias associadas, torna-se limitado. Brandão e colaboradores (2003) em seu trabalho de revisão sobre a organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade destacam que os trabalhos do naturalista inglês Charles Darwin (1872) indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem (BRANDÃO et al., 2003). Onde, dessa forma, o homem compartilha com os animais não apenas características físicas, como também de suas emoções básicas. Atualmente, os mecanismos encefálicos que modulam as emoções, e, de maneira especial, o medo e a ansiedade, baseiam-se em estudos envolvendo animais e humanos e, mais uma vez, a peculiaridade das emoções entra em cena, uma vez que se acredita não haver um sistema único, em cadeia, permitindo a linearidade dos processos mentais relacionados às emoções, mas, sim, uma teia neurobiológica que envolve morfologia, fisiologia e comportamento, sendo esse último o produto do mecanismo biológico atrelado à maquinaria do sistema nervoso central. Sendo assim, e apoiado nessa perspectiva morfofuncional aliada ao comportamento, e frente ao advento de novas ferramentas farmacológicas, o presente estudo busca contribuir para as bases neurais da emoção frisando, de maneira exclusiva, em um estado, que, dependendo da forma em que se manifesta, ora é compreendido como uma emoção comum, ora como um transtorno, a ansiedade. Obviamente, entendê-la é algo que vai muito além das páginas dessa dissertação e, até mesmo, dos recentes estudos envolvendo a

psicofarmacologia desse estado emocional. Todavia, ao longo dos tempos, o conhecimento adquirido através da pesquisa básica em modelos animais experimentais possibilitou o surgimento de técnicas de medição comportamental que, apesar de suas limitações, são consideravelmente viáveis para subsidiarem demais estudos, sobretudo aqueles que buscam preencher cada vez mais as lacunas ainda existentes nas bases neurais da ansiedade.

1.1 Ansiedade e o Sistema Encefálico Aversivo

A ansiedade, (do grego *anshein*: estrangular, sufocar, oprimir) é um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão ou desconforto derivado de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho (SWEDO et al., 1994; ALLEN et al., 1995; CASTILLO et al., 2000). No entanto, Graeff (1994), acrescenta uma conotação mais específica para a ansiedade. Segundo este autor, além de apresentar essa natureza subjetiva, e ser, na sua essência, não prazerosa e desconfortável, a expressão plena da ansiedade envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (GRAEFF, 1994).

Dias e colaboradores (2013) esclarecem mais sobre a distinção entre a ansiedade e o medo. Para esses autores, mesmo que manifestações físicas e psicológicas geradas pela ansiedade ou o medo compartilhem aspectos comuns, elas são duas entidades independentes e que merecem definições operacionais. Assim, segundo esses mesmos autores, a ansiedade é considerada como um estado emocional gerado a partir de estímulos gerais e não específicos, que são percebidos como potencialmente ameaçadores no futuro. Enquanto que o medo é estimulado por estímulos específicos, resultando em respostas defensivas ativas que gradualmente diminuem quando o estímulo específico não está mais presente no ambiente (DIAS et al., 2013). Porém, ambos estados emocionais estão relacionados aos comportamentos defensivos dos animais.

Graeff e Guimarães (2005) ressaltam no que diz respeito à ansiedade e ao medo (uma emoção relacionada à ansiedade), que a perspectiva evolutiva, inicialmente proposta por Darwin, leva a pensar que tais emoções estão associadas

a diferentes estratégias de defesa que ocorrem em resposta a perigos que determinada espécie animal encontra invariavelmente em seu nicho ecológico. Assim, dentro deste contexto, esses processos emocionais são vistos como fenômenos que apresentam claro valor adaptativo (CARVALHO-NETTO, 2009). Em contrapartida, quando essas emoções superam níveis considerados de normalidade, podem interferir significativamente com a vida do indivíduo, afetando desde processos fisiológicos até o convívio social, prejudicando a execução de tarefas básicas (DIAS et al., 2013), passando, assim, a serem consideradas como transtorno.

Perante este cenário, os transtornos de ansiedade são os mais prevalentes e economicamente onerosos de todos os diagnósticos psiquiátricos; no entanto, estão entre os mais comumente subdiagnosticados e subtratados (BERRIOS et al., 1996; NARDI, 2012). O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais na sua quinta edição (DSM-V, APA, 2013) classifica os transtornos de ansiedade nas seguintes categorias: *Transtorno de Ansiedade de Separação; Mutismo Seletivo; Fobia Específica; Transtorno de Ansiedade Social (Fobia Social); Transtorno do Pânico; Agorafobia; Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG); Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância/Medicação; Transtorno de Ansiedade Devido a uma condição Médica e Transtorno de Ansiedade Inespecífico.*

É importante frisar que além dos transtornos ansiosos poderem apresentar sobreposição considerável de sintomas entre si, apresentando características centrais de medo e preocupação, eles também apresentam muita sobreposição de sintomas com outras patologias mentais, como por exemplo, a depressão (STAHL, 2011).

A investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (principalmente em roedores de laboratório: ratos e camundongos) tem contribuído de forma significativa para o entendimento das bases neurais relacionadas aos transtornos de ansiedade (CARVALHO-NETTO, 2009). Além do mais, estratégias de defesa são expressas em condições naturais, quando, por exemplo, um predador está muito próximo ou em contato direto com a presa ou quando há pistas da presença do predador (GRAEFF, 2002; para revisão ver BLANCHARD; BLANCHARD, 2001).

É diante desse contexto que a abordagem eto-experimental proposta por Robert e Caroline Blanchard em 1989, em seus estudos envolvendo as estratégias defensivas de animais contra predadores, traz a concepção de ansiedade como a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco que é evocado em situações em que o perigo é incerto (ameaça potencial), seja porque o contexto é novo ou porque o estímulo do perigo esteve presente no passado, mas não está mais no meio ambiente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989). Em um dos seus estudos, o casal de pesquisadores investigou a participação da amígdala nas categorias comportamentais defensivas promovidas por exposição a um predador. Nesse estudo, lesões geradas por rádio-frequência na amígdala mostraram redução de comportamento de imobilidade na presença de gato ou a estímulos previamente neutros associados a choques nas patas. Este padrão de alterações de reatividade a estímulos de medo e ansiedade levou ao casal de pesquisadores à proposta de que a amígdala tem um papel central na regulação de reações defensivas e da ansiedade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972).

Diante deste exposto, estudos clássicos no campo do medo e da ansiedade têm proposto abordagens com base em estruturas encefálicas para tentar explicar os mecanismos, vias e conexões neurais que participam dessa circuitaria (para revisão ver Gross e Hen (2004), Etkin (2010), Myers-Schulz e Koenigs (2012) e Dias e colaboradores (2013)). Segundo Carvalho-Netto (2009), compreendem essas abordagens o sistema encefálico aversivo (GRAEFF, 1981), o sistema de inibição comportamental (SIC) (GRAY; McNAUGHTON, 2000), a integração de ambos, realizada inicialmente por Gray e McNaughton (2000) e, posteriormente por McNaughton e Corr (2004), seguido pelo sistema hipotalâmico de defesa (SHD). Este último, mais atual, proposto pelo grupo de pesquisa de Canteras e colaboradores (2001, 2002).

O sistema encefálico aversivo (SEA) (Figura 1), proposto por Graeff em 1981, também chamado de sistema de fuga/luta ou sistema cerebral de defesa, diz respeito aos mecanismos e estruturas encefálicas associadas à resposta de medo. Como base dos primeiros achados para a consolidação desse sistema, experimentos pioneiros realizados por Hess e Brugger em 1943 mostraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial possui propriedades aversivas. Ademais,

estudos posteriores, inclusive aqueles realizados por laboratórios brasileiros, mostraram também que, além do hipotálamo medial, a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal também produzia comportamento de fuga (BRANDÃO et al., 2003) e que diferentes padrões de comportamento de imobilidade organizados nessa mesma estrutura encefálica, estavam associados com diferentes tipos de ansiedade (BRANDÃO et al., 2008).

A amígdala também exerce importante papel com o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal, e essas três estruturas encefálicas, juntas, compreendem o substrato neural do SEA. Conforme ressalta Brandão e colaboradores (2003) na sua revisão sobre a organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade, essas manifestações comportamentais promovidas por estimulação nessas estruturas compreendem uma reação de defesa que normalmente acompanha os estados aversivos característicos do medo e da ansiedade. Adicionalmente, há evidências de que outras estruturas encefálicas como o colículo superior e colículo inferior, que processam informações visuais e auditivas, respectivamente, também participem do sistema cerebral aversivo (MACEDO et al., 2002; NOBRE et al., 2010) (Figura 1).

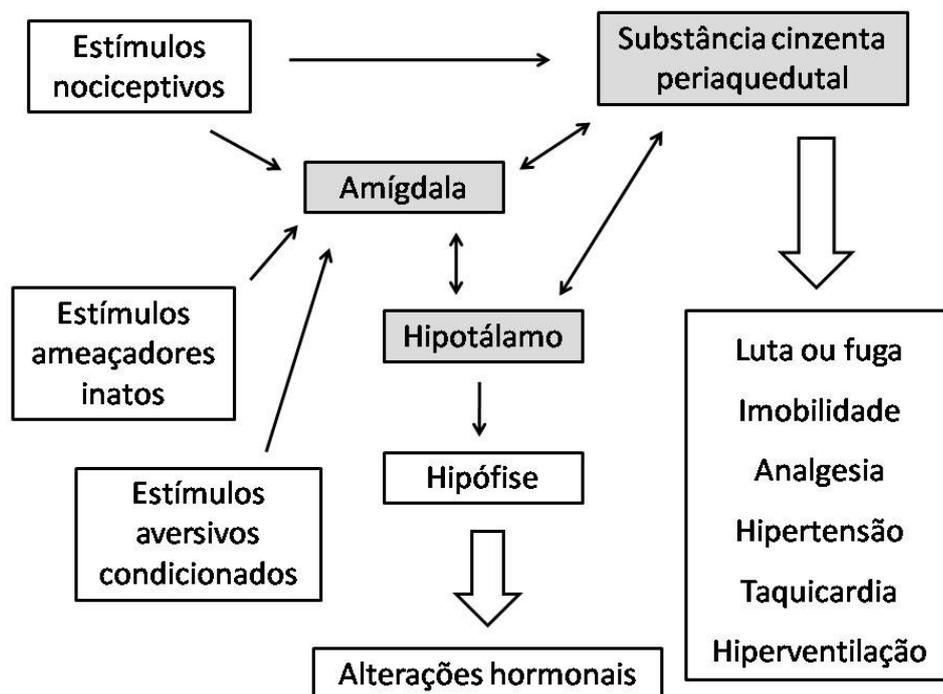


Figura 1. Diagrama representando o Sistema Encefálico Aversivo. Os mecanismos associados à resposta de medo estão associados ao sistema de luta/fuga ou sistema cerebral de defesa. A estimulação química ou elétrica de determinadas estruturas cerebrais localizadas mais rostralmente como a amígdala ou o hipotálamo medial, produzem um padrão típico de respostas de medo, que são acompanhadas de uma atividade motora intensa, assim como de reações neurovegetativas, dentre as quais o aumento na pressão arterial e alterações na frequência cardíaca, respiração, analgesia e imobilidade, semelhantes àquelas evocadas quando o animal é confrontado com estímulos aversivos ou dolorosos em situação natural, e que são permanentemente suprimidos após lesão na substância cinzenta periaquedutal (Brandão et al., 2003, 2008; Vianna; Brandão, 2003). Esquema adaptado de Graeff e Guimarães (2005).

No que diz respeito à neurobiologia da ansiedade, é proposta uma desregulação, ou seja, um desequilíbrio neuroquímico envolvendo diversos sistemas de neurotransmissão em áreas como amígdala, córtex pré-frontal, substância cinzenta periaquedutal, hipocampo e hipotálamo (GRAEFF; GUIMARÃES, 2005). Adicionalmente, é importante destacar que além das áreas que compreendem o SEA, outras estruturas encefálicas, como aquelas presentes no SIC como o giro do cíngulo posterior e o sistema septo-hipocampal (McNAUGHTON; CORR, 2004; McNAUGHTON, 2011) bem como estruturas presentes no SHD (CANTERAS et al., 2001, 2002, 2003) vêm sendo citadas na mediação dos comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo. Ademais, áreas como o núcleo mediano e

dorsal da rafe (para revisão ver ANDRADE et al., 2013; KAIYALA et al., 2003); o córtex orbital ventrolateral (GUYER et al., 2008); o *locus coeruleus* (MCCALL et al., 2015) e o núcleo *accumbens* (LEVITA et al., 2012). De particular interesse para o presente estudo, muitos trabalhos têm sido realizados enfatizando a substância cinzenta periaquedutal, mais especificamente na sua porção dorsal, na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade (LITVIN et al., 2007; CAMPLESI Jr et al., 2012; KINCHESKI et al., 2012; QUINTINO-DOS-SANTOS et al., 2014; e, para revisão ver NOGUEIRA; GRAEFF, 1995 e GRAEFF; ZANGROSSI, 2010).

1.2 A Substância Cinzenta Periaquedutal

A Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) (Figura 2) é uma estrutura neuroanatômica composta por núcleos neuronais que circunda o aqueduto cerebral (aqueduto mesencefálico) e é dividida em colunas que se estendem ao longo do eixo rostro-caudal denominadas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (BEITZ, 1985; BANDLER; De PAULIS, 1991; CARRIVE, 1993; BANDLER et al., 2000; LINNMAN et al., 2012) (Figura 3). A parte mais rostral da SCP coincide com comissura posterior, e a parte mais caudal está situada ao nível do núcleo tegmentar dorsal (BEHBEHANI, 1995).

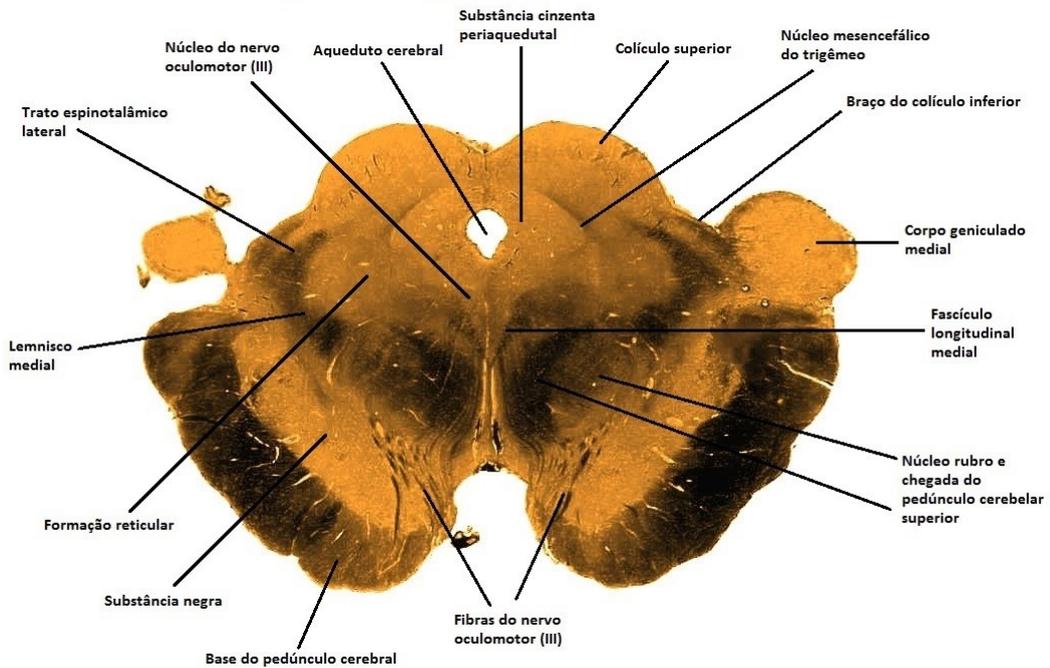


Figura 2. Corte coronal a nível do mesencéfalo do cérebro humano mostrando a substância cinzenta periaquedutal. Imagem retirada do site didático do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (Unicamp). (Imagem usada com permissão). Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/neuroanatmesencefalo.html#superior>. Acessado em: 06/07/2015

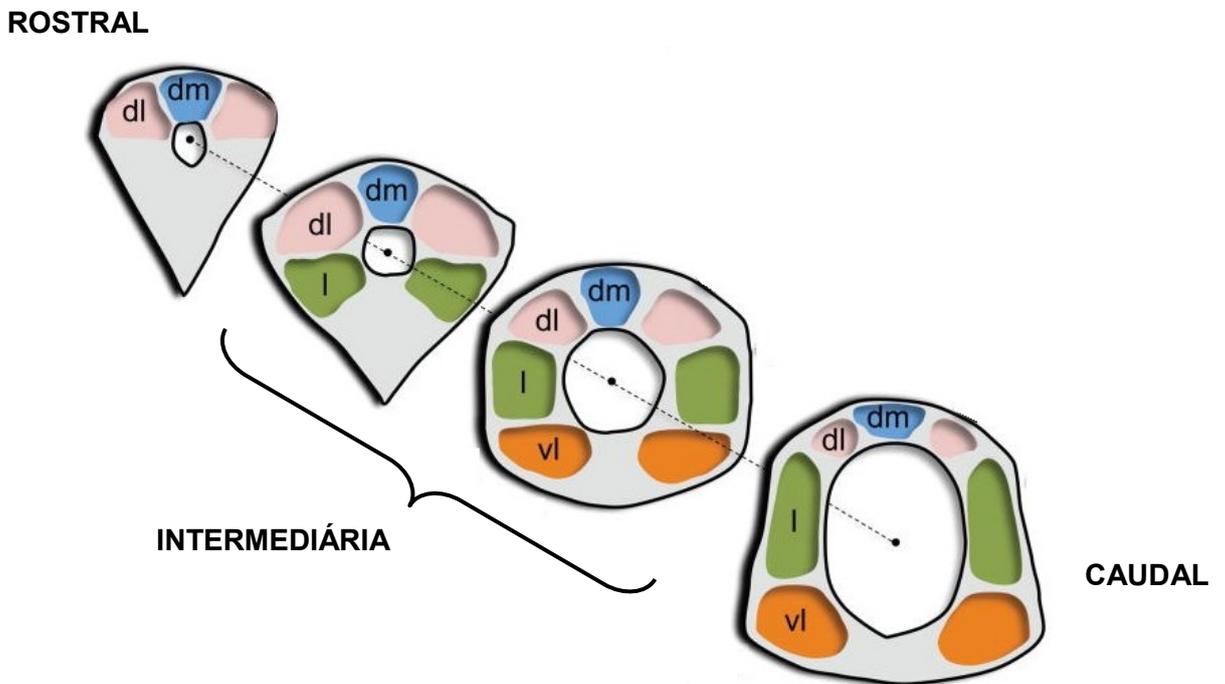


Figura 3. Ilustração esquemática das colunas neuronais dorsomedial (dm), dorsolateral (dl), lateral (l) e ventrolateral (vl) das porções rostral, intermediária e caudal da Substância Cinzenta Periaquedutal – SCP. (Adaptado de Linnman et al., 2012).

A SCP é um importante sítio ascendente relacionado à transmissão da dor. Ela recebe aferências de neurônios nociceptivos na medula espinhal e envia projeções para núcleos talâmicos que processam a nocicepção. É também um componente principal do sistema inibitório descendente da dor (BEHBEHANI, 1995). Além da sua participação no processamento da dor, esta área está envolvida em uma série de funções, como vocalização, receptividade sexual, comportamento maternal, responsividade ao medo, e contém neurônios que integram o comportamento de defesa, como a fuga, as reações de congelamento e a imobilidade tônica mediante estímulos diversos (MISSLIN, 2003). Em humanos, já é documentado que a estimulação da SCP produz medo (NASHOLD, 1969).

Corroborando com estes achados, alguns estudos têm mostrado que a estimulação elétrica e química da SCP causam respostas defensivas, enquanto que lesões nesta área reduzem essa resposta (para revisão ver MISSLIN, 2003), e podem até eliminar completamente a resposta defensiva (GREG; SIEGEL, 2001).

Estudos clássicos, como aqueles realizados por Hunsperger (1956) têm mostrado que a lesão na SCP resulta num animal muito passivo que parece não apresentar reação defensiva quando confrontado com um predador (para revisão ver CANTERAS, 2003). Relatos na literatura ainda mostram que, quando em resposta ao encontro com o predador, há a mobilização de locais específicos da SCP, tais como as colunas dorsolateral (SCPDl), dorsomedial (SCPDm) e ventrolateral (SCPVI) (CANTERAS; GOTO, 1999; COMOLI et al., 2003). Adicionalmente, como sugerido por Keay e Bandler (2001), a coluna dorsolateral da SCP parece estar particularmente envolvida na integração de respostas ao estresse, enquanto que a coluna ventrolateral da SCP integra respostas condicionadas a estímulos aversivos (VIANNA et al., 2001) e, ambas, dorsolateral e ventrolateral, envolvidas em tipos diferentes de medo (VIANNA et al., 2001).

Além disso, ao interagir com a amígdala, a porção dorsal da SCP (SCPD) se integra com um importante sítio para o processamento do medo e da ansiedade e sua lesão altera o medo e a ansiedade produzidos pela estimulação elétrica ou química na amígdala (BEHBEHANI, 1995). Adicionalmente, tem sido postulado que essas duas estruturas, a amígdala e a SCP, juntamente com o hipotálamo medial

constituem os principais substratos neurais para a integração dos estados aversivos no cérebro (BRANDÃO et al., 1999).

Cada uma das regiões da SCP parece estar associada a diferentes funções. Por exemplo, estimulação da porção dorsal e lateral da SCP, no rato, pode provocar comportamentos defensivos caracterizados como congelamento, imobilidade, corrida, salto, taquicardia e aumento da pressão sanguínea e tônus muscular. Em contrapartida, a estimulação da porção ventrolateral da SCP pode resultar em uma postura imóvel, conhecida como quiescência, enquanto que sua inibição leva ao aumento da atividade locomotora (para revisão, ver os trabalhos de De OCA et al., 1998 e LINNMAN et al., 2012).

Também tem sido observado que a estimulação elétrica ou química da porção dorsal dessa área promove a expressão de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, como aquelas de esquiva inibitória em ratos submetidos ao teste do labirinto em T elevado (CAMPLESI et al., 2012). Além disso, também tem sido mostrado que a estimulação de receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT_{1A}) e 2A (5-HT_{2A}) presentes na porção ventrolateral da SCP promoveu efeito do tipo ansiolítico em ratos expostos ao teste do labirinto em t elevado, quando verificado a diminuição da latência dos animais para os braços abertos do aparato (De PAULA SOARES; ZANGROSSI Jr., 2009).

Como parte da investigação científica das bases neurais da ansiedade está relacionada a diferentes sistemas de neurotransmissores envolvidos, vários estudos têm objetivado, em suas pesquisas, conhecer o papel dos diferentes receptores de serotonina na SCP (MORAES et al., 2008; NUNES-DE-SOUZA et al., 2008; POBBE et al., 2011; JEONG et al., 2013; e para revisão ver GRAEFF, 2004).

1.3 A relação serotonina, ansiedade e substância cinzenta periaquedutal

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT, Figura 4A) é uma monoamina que atua como neurotransmissor, cuja biossíntese é realizada a partir do aminoácido triptofano, sendo, portanto, sua produção dependente da enzima triptofano-5-

hidroxilase (Figuras 5). Foi inicialmente descrita em humanos na década de 1930 em células enterocromafins do trato gastrointestinal devido ao seu efeito de contratilidade da musculatura uterina (JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008), sendo isolada e caracterizada no sangue por Rapport e colaboradores em 1948 (RAPPORT et al. 1948). Posteriormente, no ano de 1955, foi encontrada no cérebro de mamíferos e classificada como neurotransmissor (FILIP; BADER 2009). No SNC, os corpos celulares e dendritos dos neurônios contendo serotonina são encontrados principalmente nos núcleos dorsal (DRN) e mediano (MRN) da rafe, localizados na linha média do tronco cerebral, com ampla distribuição de fibras pelo encéfalo, promovendo a secreção desse neurotransmissor em terminais nervosos serotoninérgicos (AZMITIA; SEGAL, 1978; BOBILIER et al., 1975) (Figura 4B).

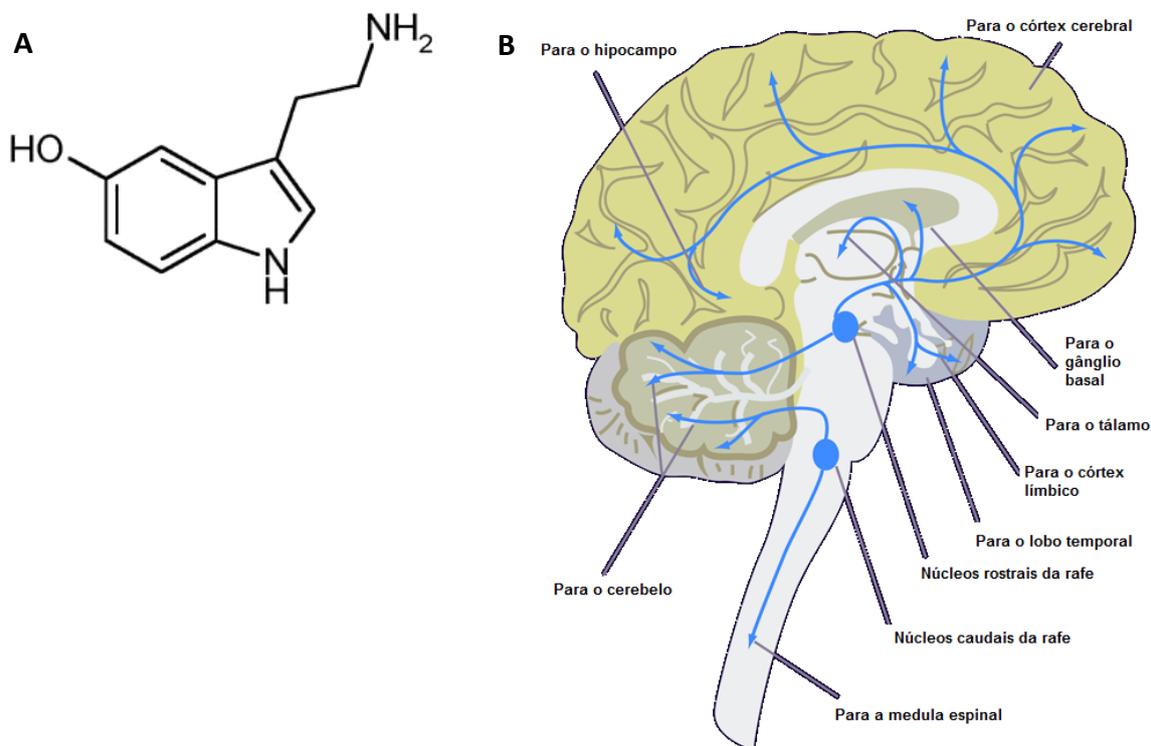


Figura 4. (A) Estrutura da monoamina serotonina, (5-Hidroxitriptamina – 5-HT) conforme Kitson, (2007) e Gellynck et al., (2013). (B) Vias de distribuição encefálica de serotonina no cérebro humano. Os principais centros de neurônios serotoninérgicos são os núcleos rostral e caudal da rafe. Dos núcleos rostrais da rafe ascendem axônios para o córtex cerebral, regiões límbicas e especificamente para o gânglio basal. Os núcleos serotoninérgicos no tronco encefálico originam axônios descendentes, alguns dos quais terminam na medula espinal. Disponível em: https://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/normal_brain/neuro_path_sn.

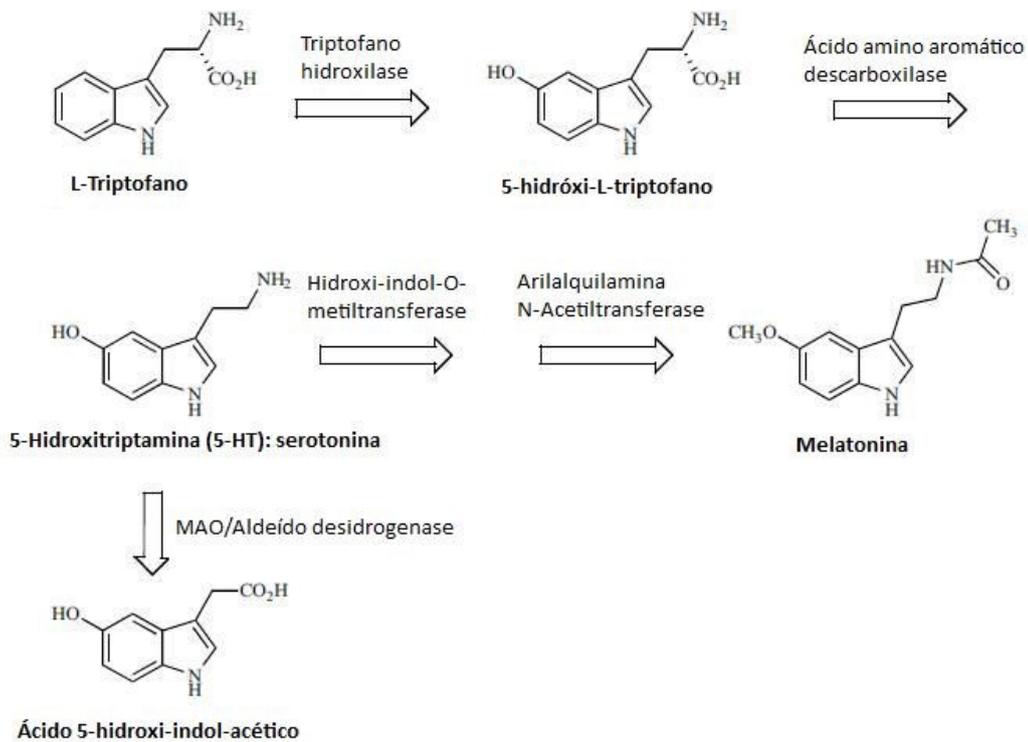


Figura 5. Representação simplificada da biossíntese da serotonina e seus metabólitos. MAO: monoamina oxidase (Adaptado de Kitson, 2007).

Alguns trabalhos baseados em revisões da literatura científica têm relatado sobre a serotonina e o número de receptores em que esse neurotransmissor pode ligar-se (KITSON, 2007; TERRY Jr., et al., 2008; GELLYNCK et al., 2013). Embora haja divergências entre os autores quanto ao número preciso de receptores em que esta indolamina possa se ligar e, conseqüentemente promover seus efeitos intracelulares, é considerado atualmente que a serotonina apresenta 16 subtipos de receptores, delineados por análises farmacológicas e clonagem dos seus respectivos DNA complementares (cDNA), sendo agrupados em sete diferentes subfamílias ou classes, com base nas suas repostas farmacológicas a ligantes específicos, similaridades de sequência no gene que os codifica e nos níveis de aminoácidos, na organização gênica e nos mecanismos de transdução intracelular (PYTLIAK et al., 2011) (Figura 6). Essas famílias são designadas da seguinte forma: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇. Todos esses sete subtipos de

receptores são expressos no SNC (RAYMOND et al., 2001; MELTZER et al., 2003; BOCKAERT et al., 2006).

A maioria das classes de receptores serotoninérgicos é do tipo metabotrópico, ou seja, medeia a cascata de transdução de sinal via proteína G. Receptores do tipo 5-HT₁ são acoplados à proteína G inibitória (Gi), que inibe a enzima adenilato ciclase (AC), levando à diminuição das concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Em contrapartida, receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ são acoplados à proteína G estimulatória (Gs), que ativa a enzima adenilato ciclase, contribuindo para o aumento de cAMP e, conseqüentemente, para a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Também sendo considerado receptor metabotrópico, porém com mecanismo celular distinto, receptores do tipo 5-HT₂ são acoplados à proteína G quinase (Gq), que ativa a enzima fosfolipase C, a qual converte fosfolípidos a diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃), levando ao aumento nas concentrações intracelulares desses compostos (PYTLIAK et al., 2011). Diferentemente dos demais receptores, os receptores 5-HT₃ e seus subtipos 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B} e 5-HT_{3C} são canais iônicos formados de cinco subunidades que organizadas formam um poro central, permeáveis a íons cálcio (Ca²⁺), sódio (Na²⁺) e potássio (K⁺), sendo portanto, receptores ionotrópicos, que quando estimulados resultam em alta despolarização da membrana plasmática. Por fim, apesar de não estar bem estabelecido, acredita-se que os receptores do tipo 5-HT₅ acoplam-se de maneira curiosa a um determinado tipo de proteína G, capaz de inibir a adenilato ciclase e estimular a abertura de canais de cálcio sensíveis à IP₃ (KITSON, 2007).

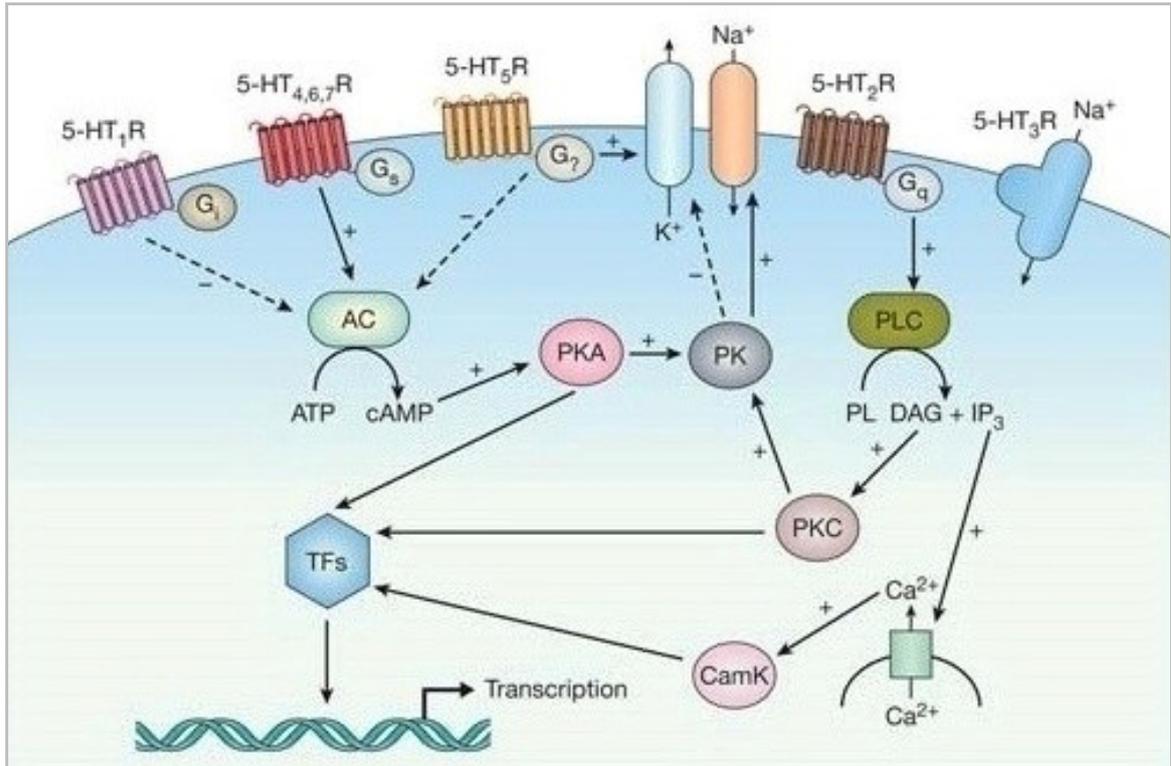


Figura 6. Diversidade de receptores da serotonina (5-HTRs) e seus efeitos intracelulares. Os receptores da serotonina são agrupados em sete famílias baseadas nas vias de efeitos intracelulares e na homologia de sequência. Com exceção do receptor 5-HT₃, todas as outras classes de receptores serotoninérgicos são acopladas à proteína G. Os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ são acoplados à proteína G estimulatória (G_s), que ativa a enzima adenilato ciclase (AC). A adenilato ciclase sintetiza monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) para a produção de adenosina trifosfato (ATP). O cAMP ativa a proteína quinase dependente de cAMP, também conhecida como proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila proteínas quinases intermediárias (PKs), que modulam a atividade dos canais iônicos, resultando em despolarização do neurônio. Em contraste, receptores 5-HT₁ são acoplados à proteína G inibitória (G_i), que inibe a AC, resultando em hiperpolarização. Receptores 5-HT₂ são acoplados à proteína G quinase (G_q), que ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A PLC cliva fosfolípidos (PL) a diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃). O DAG ativa proteína quinase do tipo C (PKC) que ativa PK a fim de modular os canais de cátions e despolariza o neurônio. IP₃ atua liberando íons Ca²⁺ de estoques intracelulares, contribuindo também para a despolarização. O Ca²⁺ ativa a proteína quinase dependente de calmodulina/Ca²⁺ (CamK), que, juntamente com PKA e PKC, influencia a transcrição através da fosforilação de fatores de transcrição (TFs). Receptores 5-HT₅ foram relatados a acoplar-se negativamente a AC e positivamente aos canais de Ca²⁺ sensíveis à IP₃. Os receptores 5-HT₃ são ligantes não seletivos de canais de cátions que resulta em alta despolarização quando ativados. As linhas sólidas indicam efeitos estimulatórios; linhas tracejadas, efeitos inibitórios. (Adaptado de Lam e Heisler, 2007, tradução nossa).

Desempenhando importante papel no sistema nervoso central, local este onde contém menos do que 5% da distribuição total de serotonina no corpo humano, este neurotransmissor participa de várias funções fisiológicas, tais como a dor, o

apetite, o sexo, a emoção, o sono, a memória e também nos seus estados de doença associados, tais como a depressão, ansiedade, fobia social, esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo e pânico (KITSON, 2007).

Devido estudos pioneiros mostrarem que a administração de determinados fármacos e em determinadas regiões encefálicas diminuiriam os níveis encefálicos deste neurotransmissor, promovendo, por conseguinte, um efeito do tipo ansiolítico em modelos experimentais, até mesmo comparáveis aos dos benzodiazepínicos em testes de conflito (GRAEFF; SCHOENFELD, 1970), a relação da serotonina e o seu papel na ansiedade têm sido amplamente reproduzido e confirmado (GRAEFF, 2002; GORDON; HEN, 2004; MILLAN, 2003), o que faz esse sistema de neurotransmissão ser um dos mais importantes e estudados quanto à sua relação com os comportamentos defensivos.

Em concordância com isso, é importante salientar que, assim como os sistemas de neurotransmissão GABAérgico, dopaminérgicos e neuropeptidérgicos, o sistema de neurotransmissão serotoninérgico compreende também um dos mecanismos de mediação da ansiedade no SEA (GRAEFF, GUIMARÃES, 2000; BRAGA et al., 2010).

Alguns estudos têm mostrado que a serotonina exerce um papel inibitório nas respostas comportamentais de medo e fuga induzidos pela estimulação aversiva da porção dorsal na SCP (para revisão ver BRANDÃO et al., 1999). Corroborando com estes estudos, outros trabalhos têm mostrado que a serotonina causa efeitos antiaversivos por atuar em receptores do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} na SCPD (NOGUEIRA; GRAEFF, 1995). Além disso, a microinjeção do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT na SCPD, diminuiu o comportamento defensivo provocado por microinjeções do ácido 1-homocisteico nesta estrutura e a administração sistêmica do antagonista 5-HT_{1A}, WAY-100635, inibiu este efeito (BECKETT; MARSDEN, 1997). Também foi visto em um estudo com gatos que a ativação de receptores 5-HT_{1A} na SCP bloqueou a ocorrência de comportamentos defensivos provocadas por estimulação elétrica do hipotálamo medial, enquanto que a ativação de receptores 5-HT_{2A/C} facilitou esta ocorrência (SHAIKH et al., 1997).

Adicionalmente, Gomes e Nunes-de-Souza (2009) observaram num estudo baseado no paradigma de animais expostos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado, que camundongos expostos previamente ao aparato apresentavam diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade quando recebiam administração intra-SCPD de um agonista preferencial de receptores 5-HT_(2A/2C), DOI, e de um agonista seletivo de receptores 5-HT_{2C}, o MK-212, porém não do agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT. Além disso, tal efeito foi predominantemente observado nos animais que também receberam infusão de DOI ou MK-212 na primeira exposição (GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009).

Outros estudos básicos envolvendo a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} na ansiedade, têm sido conduzidos em um teste capaz de gerar, em um mesmo animal, dois tipos de comportamentos de defesa, a esquiva e a fuga (GRAEFF et al., 1993; VIANNA et al., 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997). Estudos de validação farmacológica deste teste, o labirinto em T elevado (LTE), propõe que a esquiva é um comportamento correlacionado à ansiedade, enquanto que a fuga, um comportamento relacionado ao pânico (GRAEFF et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2000; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). Tendo em vista que é um teste derivado do labirinto em cruz elevado (LCE), baseia-se, de igual modo, na aversão que os roedores têm de locais altos e desprotegidos.

De interesse para este estudo, tem sido demonstrado que a administração da serotonina na SCPD atua aumentando comportamentos de esquiva inibitória no LTE. Posto isso, Zanoveli e colaboradores (2003) mostraram que injeções intra-SCPD do agonista de receptores 5-HT_(2B/2C), mCPP, facilitou a expressão do comportamento de esquiva inibitória, ao passo que o agonista do receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, diminuiu essa resposta. Esses dois agonistas, a serotonina e o 8-OH-DPAT, e o agonista preferencial de receptores 5-HT_(2A/2C) DOI, inibiram o comportamento de fuga.

Corroborando com o estudo acima, outro estudo de administração local na SCPD, forneceu evidências adicionais para o papel dos receptores anteriormente mencionados. Conduzido por de Paula Soares e Zangrossi (2004), o trabalho mostrou que ratos submetidos à administração intra-SCPD do antagonista do

receptor 5-HT_{1A}, WAY-100635, bem como dos antagonistas preferenciais 5-HT_{2A} e 5-HT_(2A/2C), quetanserina e SDZ SER 082, respectivamente, não alteraram os comportamentos de ratos expostos ao LTE. No entanto, estes mesmo antagonistas foram capazes de bloquear o comportamento do tipo pancolítico promovido pela administração intra-SCPD de serotonina. Além disso, a quetanserina e SDZ SER 082 também foram capazes de antagonizar o efeito da serotonina na mediação do comportamento de esQUIVA inibitória. Ainda, a administração intra-SCPD do agonista 8-OH-DPAT e do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}, DOI, também inibiram a fuga, efeito este antagonizado pelo WAY-100635 e quetanserina, respectivamente (De PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004).

Contribuindo com estes resultados, Yamashita e colaboradores (2011) mostraram que a administração intra-SCPD de serotonina ou dos agonistas seletivos do receptor 5-HT_{2C}, MK-212 e RO-600175, aumentou a esQUIVA inibitória em ratos também testados no LTE, e que apenas a serotonina foi capaz de inibir o comportamento de fuga (YAMASHITA et al., 2011). Além disso, os efeitos de todos os agonistas foram prevenidos pela administração prévia do antagonista SB-242084.

Em conjunto, todos esses resultados mencionados reforçam a hipótese de que diferentes receptores serotoninérgicos da SCPD participam diferentemente da modulação de comportamentos relacionados à ansiedade.

Tendo em vista, então, a importância de se conhecer mais o papel de outros subtipos de receptores serotoninérgicos além dos já bem documentados 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} em comportamentos relacionados à ansiedade, estudos recentes têm investigado a participação do receptor de serotonina do tipo 7 (5-HT₇) em várias funções, e apontam sua importância na mediação de comportamentos defensivos, e, de maneira especial, na ansiedade (WESOŁOWSKA et al., 2006; ADRIANI et al., 2012; GUSCOTT et al., 2005; SHAHIDI; HASHEMI-FIROUZI, 2013).

Segundo Di Pilato e colaboradores (2014), este receptor foi o último membro da família de receptores da serotonina a ser identificado e clonado em rato de forma independente em três laboratórios no ano de 1993 (BARD et al., 1993; LOVEMBERG et al., 1993; RUAT et al., 1993). Posteriormente, este receptor foi clonado em outras espécies de mamíferos como camundongo (PLASSAT et al.,

1993), cobaia (TSOU et al., 1994) e humano (BARD et al., 1993). Adicionalmente, Gellynck e colaboradores (2013) relatam em seu artigo de revisão que, de acordo com o Web site www.ensembl.org, este subtipo de receptor foi clonado em mais de 50 animais. Além disso, estudos de Heidmann e colaboradores (1997) mostraram que esta classe de receptor apresenta quatro isoformas no humano, a saber: 5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} e 5-HT_{7D}. O presente trabalho busca, assim, contribuir para o conhecimento das bases neurais da ansiedade através da manipulação farmacológica deste receptor.

1.4 O receptor 5-HT₇

1.4.1 Caracterização e localização

O receptor 5-HT₇ (Figura 7) é descrito por Gellynck et al. (2013) como uma proteína com 445 aminoácidos, e que exibe um alto grau de homologia interespecífica de aproximadamente 95%, porém, com uma baixa homologia de sequência com outros receptores de serotonina (abaixo de 40%) (BONAVENTURE et al., 2002). Este subtipo de receptor 5-HT₇ é acoplado a proteína G estimulatória (Gs), com um perfil farmacológico distinto de todos os outros receptores de serotonina. Estudos mais recentes demonstraram que este receptor também pode acoplar-se à Proteína G₁₂ (Figura 7), levando a ativação de pequenas GTPases da família Rho, proteínas pertencentes a um subgrupo da superfamília Ras, que se caracterizam por serem proteínas de 20-30Kd que são ligadas à guanina trifosfato (GTP) e que regulam uma grande quantidade de funções nas células eucarióticas, como a formação de fibras de actina, e participando dos processos de adesão focal e migração celular (WENNERBERG; DER, 2004; JAFFE; HALL, 2005; BOUREUX et al., 2007).

Quando estimulado, este receptor, via proteína Gs, leva à ativação da proteína adenilato ciclase levando a um aumento nas concentrações intracelulares de cAMP (Di PILATO et al., 2014; GUSEVA et al., 2014). Além disso, também tem

vido proposto que os receptores de 5-HT₇ também podem modular a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica nos núcleos da rafe e que estes efeitos podem ter um papel na regulação dos ritmos circadianos (TOKARSKI et al., 2014).

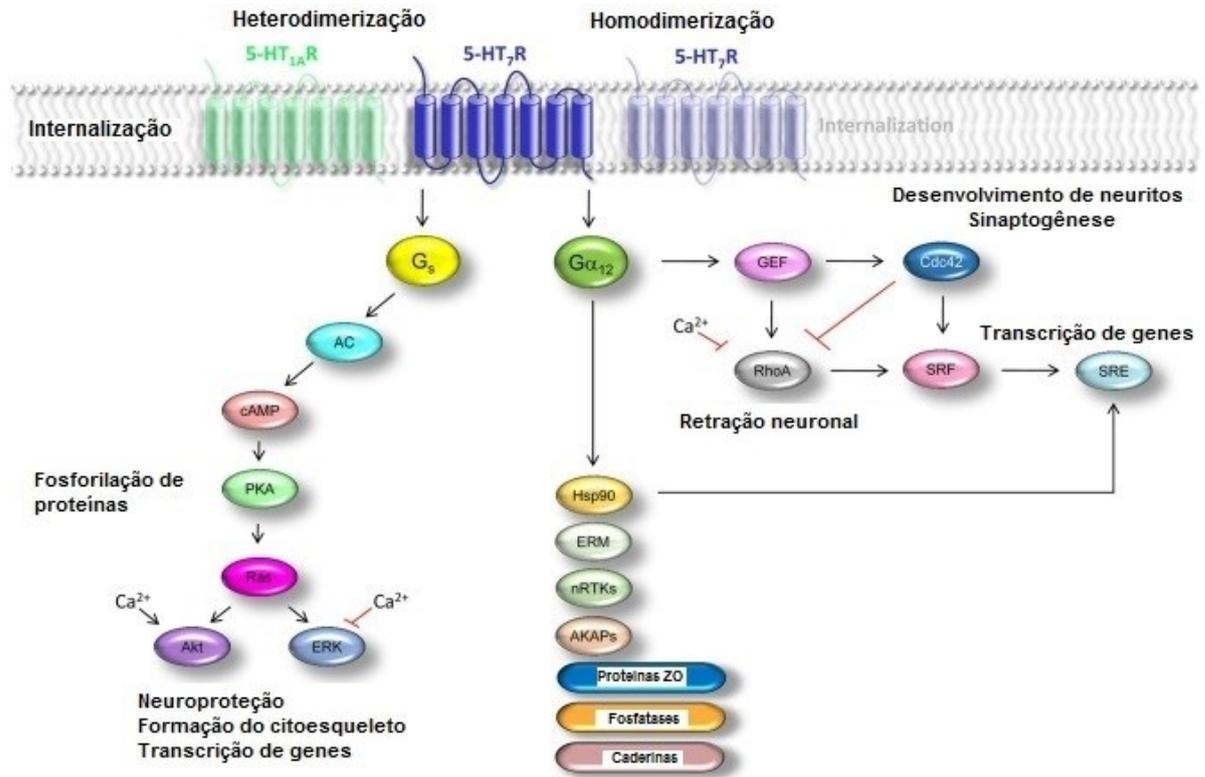


Figura 7. Representação esquemática das vias de sinalização reguladas pelo receptor 5-HT₇. Os efeitos mediados pela proteína G_s são mostradas na seção esquerda. O resumo dos processos de sinalização mediado por G₁₂ é mostrado na seção direita. Abreviações: GIRK – Protína G acoplada em canais de potássio retificadores; AC – Adenilato ciclase; cAMP – monofosfato cíclico de adenosina; PKA – proteína quinase A; ERK – proteínas quinases reguladas por sinal extracelular; Akt – Proteína quinase B; Hsp90 – Proteína de choque térmico 90; ERM – proteínas da família ezrina-radixina-moesina; GEF – Fator de troca guanina nucleotídeo (representada pela RhoGEF LARG e p155Rho associada à leucemia); nRTKs – não receptor de tirosina quinase; AKAPs – Proteína de ancoragem quinase-A; ZO – Proteína da zona ocludens; SRF – Fator de resposta sérica; SER – elemento de resposta sérica. (Adaptado de Guseva et al., 2014, tradução nossa).

No final do século XX, estudos em roedores utilizando técnicas de hibridização *in situ* e Northern blots, mostraram a presença do mRNA deste receptor no sistema nervoso central (SNC), principalmente em regiões como hipotálamo, tálamo, hipocampo e córtex cerebral (BARD et al., 1993; LOVENBERG et al., 1993;

1993; RUAT et al., 1993). Dados da literatura também relatam a presença desse subtipo de receptor em outras áreas encefálicas, como ponte, cerebelo, estriado e *tenia tecta*, tanto em células neuronais como também nas células da glia (MUNEOKA; TAKIGAWA, 2003; THOMAS; HAGAN, 2004; RUSSO et al., 2005; para revisão ver HEDLUND; SUTCLIFFE, 2004 e CIRANNA; CATANIA, 2014). Além disso, estudos autorradiográficos em encéfalos de mamíferos (incluindo o do ser humano) como os de Gustafson e colaboradores (1996), Bonaventure e colaboradores (2002) e Martín-Cora e Pazos, (2004), têm relatado a ocorrência deste receptor na SCP (Figura 8), o que torna o receptor 5-HT₇ como um possível sítio de atuação da serotonina na SCP.

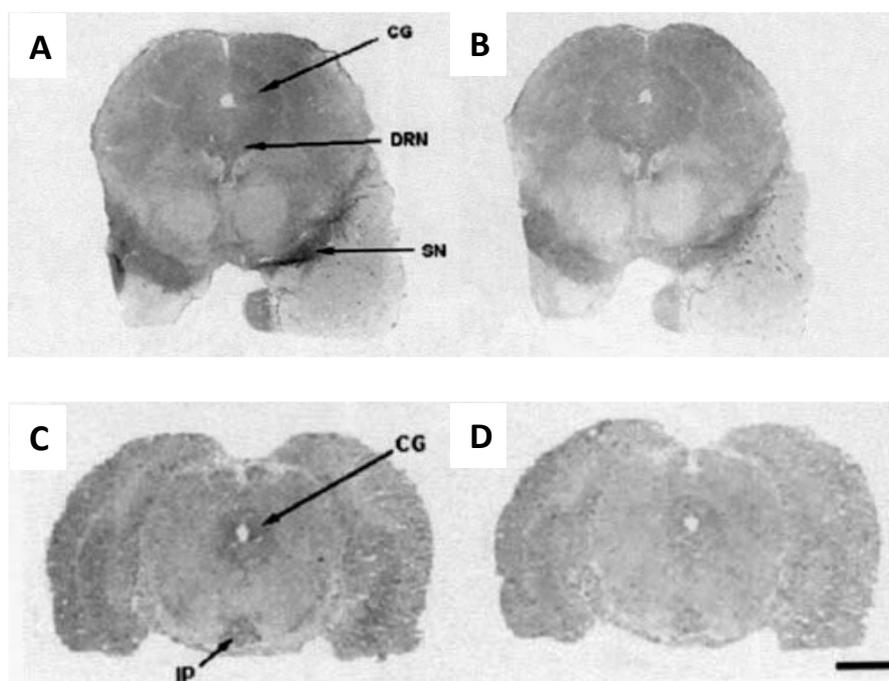


Figura 8. Distribuição autorradiográfica de receptores 5-HT₇ no cérebro humano (A e B) e de rato (C e D) através da marcação de sítios pela técnica de *binding* para a [³H]mesulergina. Secções coronais a nível do mesencéfalo. Abreviaturas: substância cinzenta periaquedutal, CG; núcleo dorsal da rafe, DRN; substância nigra, SN; núcleo interpeduncular, IP. Barra: 2mm. (Adaptado de Martín-Cora e Pazos, 2004).

1.4.2 O receptor 5-HT₇ e os estudos de pesquisa básica

Em decorrência do avanço no estudo do receptor 5-HT₇, ferramentas farmacológicas foram desenvolvidas a fim de se conhecer mais sobre a estimulação e/ou bloqueio desse subtipo de receptor serotoninérgico. A maioria desses trabalhos concentra-se em estudos utilizando principalmente o antagonista desse receptor, o SB-269970 (WESOŁOWSKA et al., 2006a, 2006b). Além disso, também têm sido realizados estudos com animais *knockout* (5-HT₇^{-/-}), os quais não expressam esse tipo de receptor (LEOPOLDO et al., 2011; BRENCHAT et al. 2012).

Uma série de estudos tem provido evidências adicionais para a importância do papel desempenhado pelo receptor 5-HT₇ em numerosas funções cerebrais, tais como sua atuação no controle do ritmo circadiano (LOVENBERG et al., 1993; GANNON, 2001; GLASS et al., 2003, ANTLE, et al., 2003; DUNCAN et al., 2004), atividade locomotora (CLISSOLD et al., 2013), aprendizagem e memória (PEREZ-GARCIA et al., 2005; MENESES et al., 2008), regulação da temperatura corporal (GUSCOTT et al., 2003; BRENCHAT et al. 2012), relaxamento do músculo liso das artérias cerebrais (TERRON; FALCON-NERI, 1999), sono (THOMAS et al., 2003; MONTI, 2010; MONTI; JANTOS, 2014), bem como em condições fisiopatológicas, como processos inflamatórios no SNC (MAHE et al., 2005); esquizofrenia (DEAN et al., 2006), dor/nocicepção (DOGRUL et al., 2009; BRENCHAT et al. 2009, 2010, 2011), depressão (GUSCOTT et al., 2005) e transtorno obsessivo compulsivo (HEDLUNG; SUTCLIFF, 2007).

No que diz respeito à contribuição dos receptores 5-HT₇ e seu papel nas categorias comportamentais relacionadas à ansiedade, o grupo de pesquisa de Wesołowska observou que a administração periférica intraperitoneal (i.p.) e intrahipocampal do antagonista de receptores 5-HT₇ SB-269970, exerceu efeito do tipo ansiolítico em ratos e camundongos submetidos a testes de ansiedade (WESOŁOWSKA et al., 2006a, 2006b). Por outro lado, Shahidi e Hashemi-Firouzi (2013) observaram ausência de efeito deste mesmo antagonista e do agonista de receptores 5-HT₇ AS-19 nos parâmetros de ansiedade no labirinto em cruz elevado, quando administrados periféricamente.

Assim, baseado nas evidências iniciais sobre papel do receptor 5-HT₇ em comportamentos relacionados à ansiedade, e considerando estudos anteriores que mostram a presença de receptores do tipo 5-HT₇ na SCP (GUSTAFSON et al., 1996; BONAVENTURE et al., 2002) torna-se interessante investigar se a ativação ou o antagonismo deste receptor na parte dorsal dessa estrutura (SCPD), alteraria as respostas de ansiedade. Assim, o presente estudo testou a hipótese de que a ativação ou o bloqueio dos receptores do tipo 5-HT₇ localizados na SCPD, poderiam alterar comportamentos relacionados à ansiedade experimental basal em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Investigar o papel dos receptores do tipo 5-HT₇ presentes na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPD) na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter uma curva dose-reposta para o agonista de receptor 5-HT₇, AS-19, nas doses de 0,05, 0,1 e 0,2 µg (intra-SCPD) e identificar dentre essas doses qual foi capaz de promover alterações comportamentais relacionadas à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado.
- Observar se a administração conjunta intra-SCPD do antagonista de receptores 5-HT₇, SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida do agonista AS-19 (0,1 µg), altera as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade no labirinto em cruz elevado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o estudo foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* com idade de 90 ± 5 dias, pesando entre 250 a 300 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os animais foram mantidos em gaiolas-viveiro retangulares de polipropileno nas dimensões de 41,4 x 34,4 x 16,8 cm, com grades em aço galvanizado superiormente removíveis e forradas com maravalha no seu assoalho. Os animais tinham acesso à água por bebedouros acoplado à grade, sendo alimentados com ração comercial Presence® *ad libitum* e mantidos em condições constantes de temperatura ($23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12:12 horas com as luzes acesas às 6:00. A higienização das gaiolas era feita duas vezes por semana, mantendo o número de cinco a seis animais por gaiola. O presente estudo foi submetido pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFRN, sendo aprovado com número de protocolo 029/2012, conforme anexo.

3.2 Cirurgia estereotáxica

Sete dias anteriores às seções dos testes de medição comportamental, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante da cânula-guia tendo em vista a administração local intra-SCPD. Primeiramente, os ratos eram anestesiados intraperitonealmente com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina nas doses de 100 e 10 mg/kg, respectivamente.

Uma vez confirmada a anestesia, era realizada a tricotomia na região dorsal da cabeça com aparelho de raspagem apropriado para este fim. Logo após, os animais foram então adaptados e imobilizados a um aparelho estereotáxico (Insight, Brasil) composto por duas barras auriculares que adentravam ao meato acústico externo de cada ouvido do animal e uma presilha frontal para ancorar os dentes incisivos superiores, o que resultava na fixação completa da cabeça do animal ao

aparelho durante todo o procedimento cirúrgico. Uma vez certificada a fixação, era realizada a limpeza do campo cirúrgico com uma solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%.

Na região da incisão era administrado previamente o anestésico local cloridrato de lidocaína (s.c.) no volume de 0,2 ml. Logo após, na região do quadríceps femoral, era administrado um antibiótico de largo espectro (*Pentabiótico Fort Dodge*) no volume de 0,2 ml (i.m.) a fim de prevenir possíveis infecções. Poucos minutos após, procedeu-se com a incisão longitudinal da pele e tecido subcutâneo a fim de expor a calvária, bem como remover o periósteo por raspagem. Depois de feita a incisão, a limpeza da calota craniana era realizada com peróxido de hidrogênio a fim de se retirar o restante de tecido subcutâneo e permitir a melhor visualização das suturas e identificar a região do lambda.

Subsequentemente, um orifício era perfurado com uma broca odontológica de aço para a fixação de um pequeno parafuso de aço inoxidável (Figura 9). Este parafuso servira como âncora para a prótese de acrílico a ser disposta no crânio do animal. Após a leitura dos parâmetros látero-lateral e dorso-ventral feitos a partir do lambda, outro orifício também era perfurado para a introdução da cânula guia (diâmetro: 0,7 mm e comprimento: 12 mm) (Figura 9), cujas coordenadas para a SCPD seguiram-se 1,9 mm lateralmente ao lambda, a uma profundidade de 3,2 mm a partir da superfície craniana, conforme as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1998). A barra vertical do aparelho estereotáxico onde estava inserida a cânula foi angulada a 22°.

Depois de calculado o valor da profundidade e descido a cânula-guia, esta era fixada à calota craniana por meio de uma resina acrílica dentária autopolimerizável. Finalmente, era introduzido pela cânula-guia um mandril de aço galvanizado (nº 8), de mesmo comprimento, para evitar possíveis entupimentos da cânula. Após a cirurgia, os animais eram aquecidos sob luz branca de lâmpada fluorescente de 25 W até a recuperação anestésica, quando então eram transferidos para suas caixas de origem e levados ao biotério do laboratório, onde permaneciam em repouso até a realização dos procedimentos subsequentes e testes comportamentais.

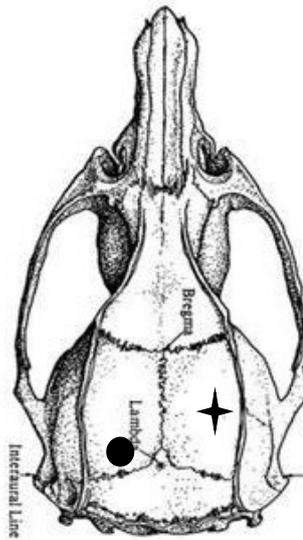


Figura 9. Identificação dos locais designados tanto da cânula-guia, como do parafuso auxiliar de ancoragem. O ponto preto indica o orifício craniano para cânula. A estrela de quatro pontas indica o local de fixação do parafuso. Adaptado do Atlas de Paxinos e Watson (1998).

3.3 Habituação

Nesse procedimento, os ratos eram levados para uma sala silenciosa, a fim de serem habituados às condições experimentais e ao experimentador. Os animais eram, um por vez, manuseados por cinco minutos com flanela e em seguida colocados numa gaiola menor, a qual era posteriormente utilizada como coadjuvante no transporte do animal ao aparato do teste comportamental. Tal procedimento era realizado duas vezes em dias distintos, sendo o último dia de manuseio 24 horas antes do início dos testes comportamentais.

3.4 Drogas, tratamentos e administração

Para o tratamento experimental, as drogas utilizadas no presente estudo foram o agonista de receptores 5-HT₇ AS-19 ([[(2S)-(+)-5-(1,3,5-Trimetilpirazol-4-yl)-2-dimetilamina]tetralina], Tocris, Bristol, Reino Unido) e o antagonista de receptores 5-HT₇ SB-269970 ((2R)-1-[(3-hidroxifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]-

pirrolidina) Tocris, Biosciences, Reino Unido). Ambas as drogas foram preparadas com solução salina (0,9%), sendo que o agonista AS-19 foi solubilizado com dimetilsulfóxido (DMSO) a 2%, enquanto que o antagonista SB-269970 foi preparado com Tween 80 a 2%. Para o procedimento cirúrgico foram utilizados quetamina (80 mg/kg/ml, i.p.), xilazina (10 mg/kg/ml, i.p.), cloridrato de lidocaína (2%, 0,2 ml por animal, s.c.) e pentabiótico (10 mg, 0,2 ml por animal, i.m.). Para o procedimento de perfusão intracardíaca, os animais foram inicialmente anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg/ml, i.p.) e perfundidos logo após com solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente acondicionados em solução de formalina (tamponada a 10%).

Para o experimento 1, foram formados dois grandes grupos: controle (veículo) que recebiam uma solução de salina (NaCl) a 0,9% acompanhada de dimetilsulfóxido (DMSO) a 2%, e um grupo experimental, que foi subdivido em três grupos conforme as doses do agonista AS-19 a ser administrada: dose 1 (AS-19 0,05 µg), dose 2 (AS-19 0,1 µg) e dose 3 (AS-19 0,2 µg). O antagonista de receptores 5-HT₇.

Para a administração conjunta (Experimento 2), foram formados oito diferentes grupos: grupo 1 – controle (veículo do antagonista [salina + tween 80 a 2%] / veículo do agonista [salina + DMSO 2%]); grupo 2 (veículo / AS19 [0,1 µg]); grupo 3 (veículo / SB269970 [5,0 nmol]); grupo 4 (veículo / SB269970 [10,0 nmol]); grupo 5 (veículo / SB269970 [20,0 nmol]); grupo 6 (SB269970 [5,0 nmol] / AS19 [0,1 µg]); grupo 7 (SB269970 [10,0 nmol] / AS19 [0,1 µg]); grupo 8 (SB269970 [20,0 nmol] / AS19 [0,1 µg]). É importante salientar que as doses usadas tanto do agonista AS-19 como do antagonista SB-269970 utilizadas no presente estudo foram calculadas com base em estudos prévios (FAN et al., 2011; SILVEIRA, 2014).

Para a administração da droga, fazia-se a contenção do animal, deixando-o inicialmente imobilizado para a retirada do mandril. Em seguida, usava-se uma agulha semelhante ao da administração, porém com o mesmo comprimento da cânula-guia implantada na cabeça do animal a fim de desentupir-la caso apresentasse alguma obstrução. Após a retirada do mandril e desobstrução da cânula-guia, a substância era administrada através de uma agulha de injeção odontológica gengival de 0,7 mm de diâmetro por 14 mm de comprimento. A agulha de injeção era conectada a um segmento de tubo de polietileno, sendo esse

conectado a uma seringa Hamilton de volume total de 10 µl e comprimento de 54,10 mm a qual era acoplada a uma bomba de microinfusão (Insight®, Brasil). No primeiro experimento, a taxa de infusão para todos os grupos que receberam administração local (intra-SCPD) foi de 0,1µl/min. Já no segundo experimento, os animais receberam administração local (intra-SCPD) do antagonista SB-269970 ou veículo, no volume de 0,2 µl durante um minuto, enquanto que a administração nos animais que recebiam o agonista AS-19 ou veículo era mantida no mesmo volume como no primeiro experimento. O deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno que era conectado à agulha da seringa, foi utilizado como instrumento visual para o monitoramento da microinfusão. Após a administração, a agulha permaneceu no interior da cânula-guia por 60 segundos, a fim de se evitar o refluxo da droga. Além disso, sempre antes e após cada injeção, a bomba de infusão era novamente acionada, com a finalidade de se verificar se a agulha de administração não estava entupida. Fazia-se esse procedimento na agulha de cada grupo experimental e de ambos os experimentos.

Foi esperado um intervalo de cinco minutos entre o final da administração e o início dos testes comportamentais em ambos os experimentos. Sendo que no segundo experimento, era esperado um intervalo de tempo de 10 minutos entre a administração inicial do antagonista e a administração seguida do agonista. O desenho experimental de cada um dos experimentos está esquematizado nas figuras 12 e 13, logo ao fim do tópico de análises estatísticas.

3.5 Testes Comportamentais

3.5.1 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um aparato feito de madeira utilizado para mensurar as variáveis comportamentais relacionadas à ansiedade. Este aparato consiste em um labirinto em forma de cruz com os quatro braços (50 cm x 10 cm) elevados a uma altura de aproximadamente 50 cm do chão, opostos entre si, onde dois desses braços são *fechados* por três paredes (duas laterais e uma distal à

plataforma central), sendo ambos perpendiculares a dois braços que são *abertos* (Figura 10).

Desenvolvido inicialmente por Handley e Mithani (1984) e validado por Pellow e colaboradores (1985), o LCE é um teste baseado na aversão natural que animais roedores apresentam pelos braços abertos do aparato (CRUZ et al., 1994; MONTGOMERY, 1955). É um método validado para explorar as bases neurobiológicas da ansiedade (TORRES; ESCARABAJAL, 2002; MEZADRI et al., 2011). Quando são forçados a permanecerem nesses braços, os roedores mostram manifestações fisiológicas e comportamentais de medo, tais como congelamento, defecação e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986). Permanecendo assim mais tempo nos braços fechados. Logo, os comportamentos relacionados à ansiedade nesse teste são interpretados com base na frequência e no tempo em que os animais passam nos braços abertos do aparato (PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986).

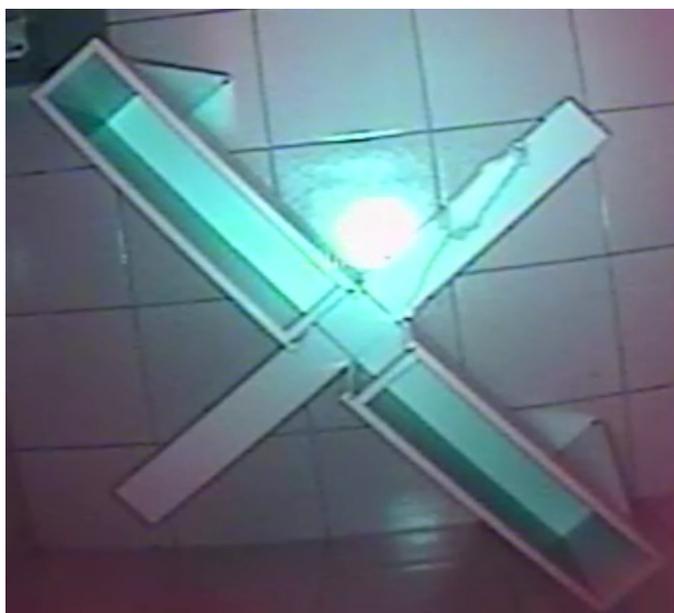


Figura 10. Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Trata-se de um aparato de madeira em forma de cruz, elevado 50 cm em relação ao solo, tendo um par de braços opostos abertos e um par de braços opostos fechados lateralmente e perpendicular aos braços abertos. É um método padrão-ouro para avaliação do comportamento do tipo ansioso em roedores (Pires et al., 2012). Acervo pessoal.

Cinco minutos após a última administração intra-SCPD de veículo ou do agonista AS-19, o animal era colocado no centro do aparato com a cabeça voltada para um dos braços fechados. O tempo total do teste foi de cinco minutos (300 segundos), sendo registrado por câmera filmadora infravermelha de teto, acoplada por um cabo a um monitor localizado numa sala ao lado onde os vídeos eram gravados para posterior análise. Nesse teste, as variáveis observadas e anotadas foram a frequência nos braços fechados (FF); frequência nos braços abertos (FA); frequência no centro (FC) e tempo de permanência nos braços abertos (TA). Com estes dados, era calculada a porcentagem de entradas nos braços abertos ($[(FA/FF+FA+FC) \times 100]$), bem como, a porcentagem de tempo gasto nesses braços ($TA/3$), além das entradas totais com ou sem a inclusão da plataforma central.

A limpeza do aparato era realizada após o teste de cada animal com solução de etanol a 5%. Todo teste era realizado em ambiente sob luz vermelha de alto comprimento de onda, em temperatura constante de 23°C, com ausência de ruídos ou barulhos.

3.5.2 Campo Aberto

O Campo Aberto (Figura 11) é um aparato feito de madeira, quadrado, medindo 60 cm de lado e paredes brancas de 60 cm de altura, com assoalho preto, sendo inicialmente desenvolvido por Hall na primeira metade do século XX (HALL 1934; HALL; BALLECHEY 1932; WALSH; CUMMINS, 1976).

O racional do teste baseia-se na investigação e avaliação de variáveis relacionadas principalmente à atividade locomotora, como também a comportamentos de ansiedade basal do animal. Com isso, sabe-se que roedores podem responder de modo aversivo a um local considerado novo. No primeiro momento, quando estes animais são colocados no centro do aparato, se deslocam normalmente para as laterais, ao passo que, só em momentos depois da exposição, começam explorar mais o ambiente considerado novo. É, portanto, segundo alguns autores, um teste baseado pelo conflito entre a motivação para explorar e a aversão a lugares abertos, desprotegidos e iluminados (ASANO, 1986; CRUSSIO et al.,

1989). Adicionalmente, como bem observa Choleris e colaboradores (2001) e Lister (1990), um aumento na ambulação (número de cruzamentos) indica uma diminuição no comportamento de ansiedade. Drogas com possíveis potenciais ansiolíticos ou ansiogênicos tendem a aumentar ou diminuir, respectivamente, a locomoção dos roedores (TREIT, 1985; SCHMITT; HIEMKE, 1998).



Figura 11. Campo aberto. (Acervo pessoal)

No presente estudo, os ratos foram submetidos ao teste do campo aberto 5 minutos após a injeção intra-SCPD de AS-19 ou veículo, a fim de testar o efeito desta droga sobre a atividade locomotora dos animais. Assim, 24 horas após o teste do LCE e cinco minutos antes de serem avaliados no teste do campo aberto, os diferentes protocolos de injeção foram realizados. Neste teste foram analisados a distância percorrida, a velocidade média dos animais ao longo dos 15 minutos, bem como o tempo, frequência e a distância percorrida na região central do aparato. Para a análise e quantificação dos dados das variáveis foi utilizado o software ANYMAZE. E, de maneira semelhante ao LCE, a limpeza do aparato era realizada após o teste de cada animal com solução de etanol a 5%.

3.6 Perfusão

Após o término dos testes comportamentais, os animais eram anestesiados com Tiopental Sódico (100 mg/kg/ml), submetidos à microinjeção de corante (Azul de Metileno), e, posteriormente, à perfusão intracardíaca com salina (NaCl a 0,9%). Após a perfusão, os encéfalos eram retirados, fixados em formol tamponado a 10% e armazenados a 6° C durante 3 dias para posterior análise histológica.

3.7 Histologia

Para a histologia, os cérebros eram cortados na espessura de 30 µm em aparelho criostato (Leica CM 15105) à temperatura de -25 a -20°C para verificação macro e microscópica do sítio de injeção, de acordo com as fotomicrografias do Atlas de Paxinos e Watson (1998). Somente os animais cujo sítio de injeção atingiu a SCPD foram considerados para análise estatística. Após a preparação das lâminas, os cortes eram fotografados com câmera fotográfica digital (Nikon DMX1200) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX41) sob lentes objetivas de aumento 2 ou 4X, utilizando para isso o o programa ACT1 (Nikon) para captura das imagens e o programa Canvas como editor das mesmas.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos tanto no teste do labirinto em cruz elevado, bem como no campo aberto foram expressos como média ± erro padrão de média (EPM), sendo inicialmente plotados e organizados em banco de dados no software Microsoft Excel (Windows 2007). Para a análise estatística, foi realizada a Análise de Variância de uma via (ANOVA one-way) no experimento 1 e de duas vias no experimento 2 (ANOVA two-way) e, quando apropriado, feita comparações múltiplas pelo teste de Post-Hoc de Tukey. Os gráficos foram realizados pelo Programa GraphPad Prisma 5 e todos os dados foram analisados estatisticamente usando o software SPSS Statistics 21 (Statistical Package for the Social Sciences/IBM) 10.1 e o nível de significância admitido para as diferenças significativas foi de 5% ($p < 0,05$).

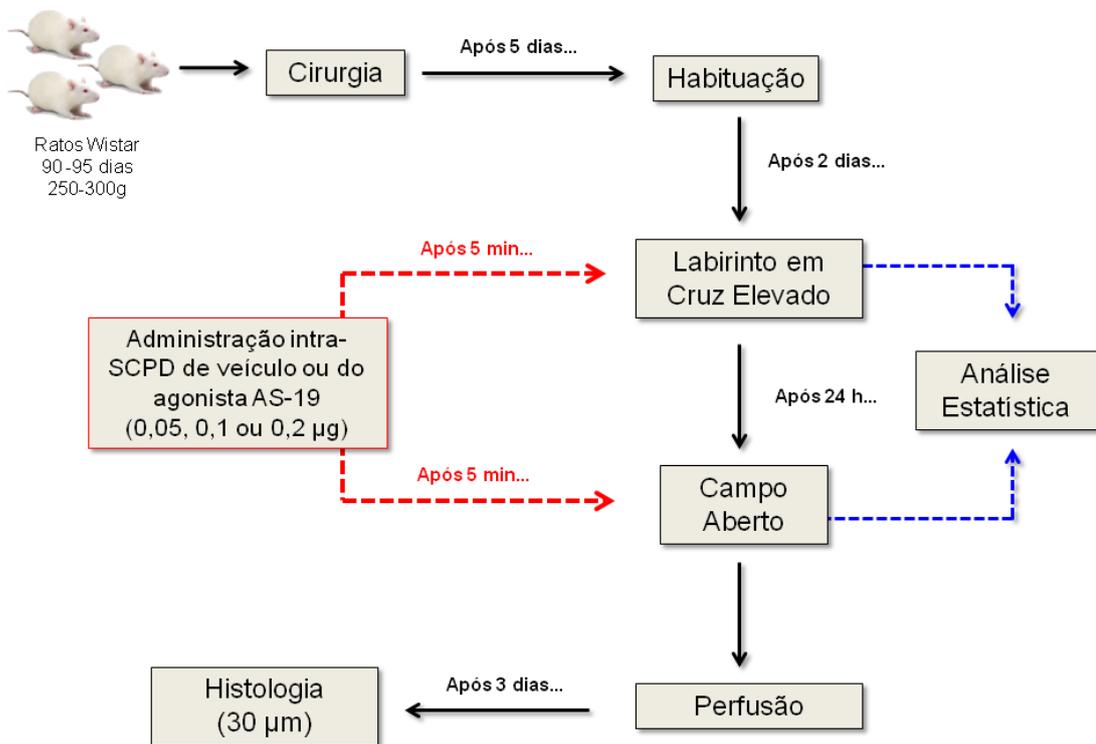


Figura 12. Protocolo experimental do experimento 1.

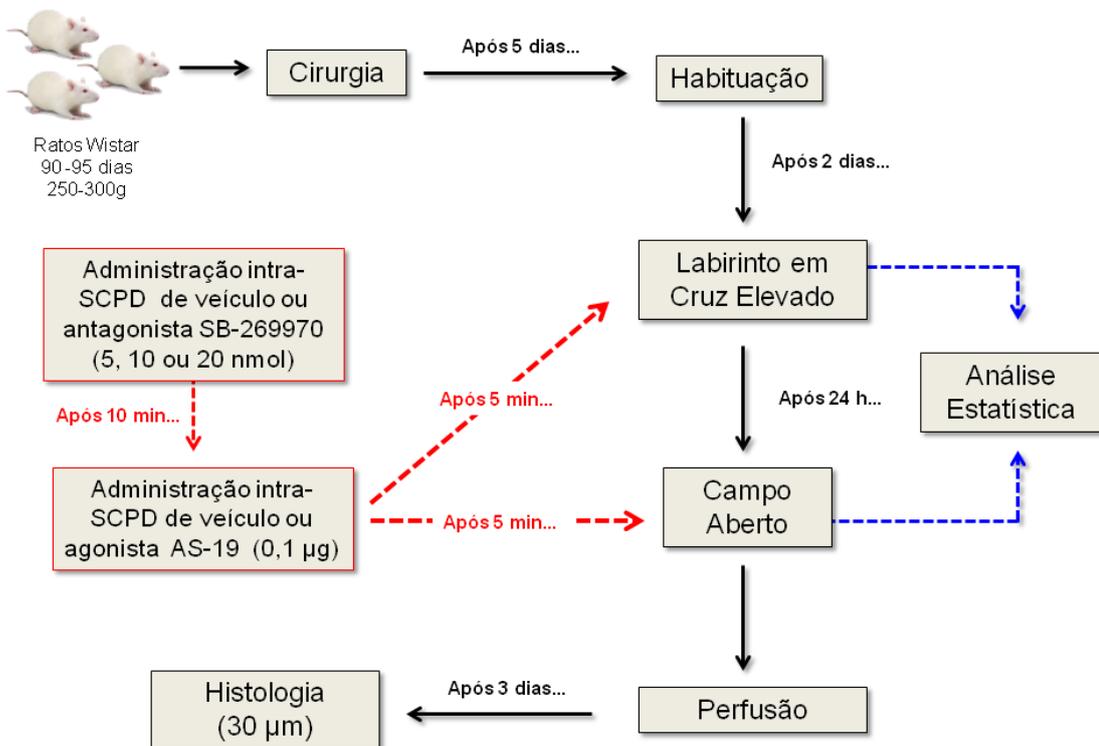


Figura 13. Protocolo experimental do experimento 2.

4 RESULTADOS

Na figura 14 é ilustrado um exemplo de sítio alvo de microinjeção do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19, do antagonista SB-269970 ou veículo na SCPD de ratos submetidos ao teste do LCE e campo aberto.

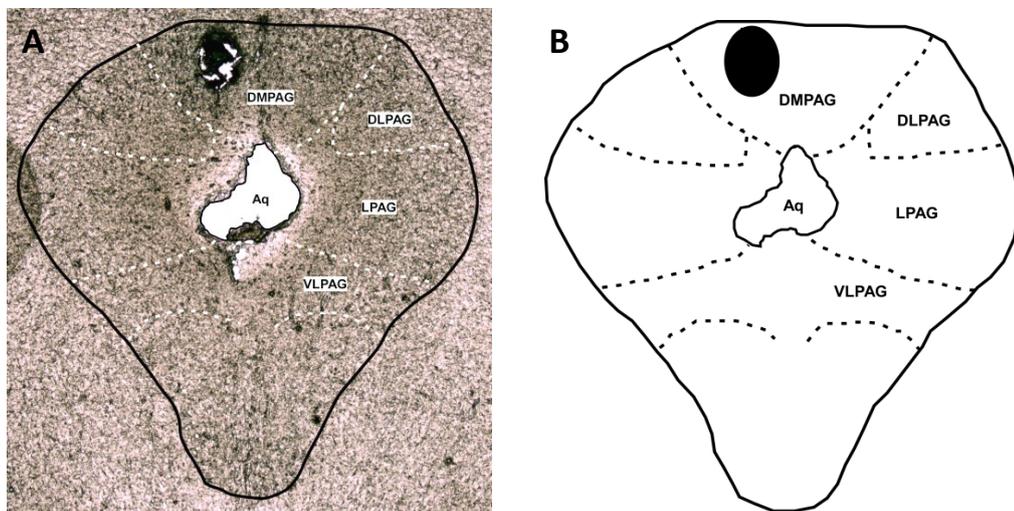


Figura 14. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal de 30 µm do mesencéfalo mostrando o sítio de microinjeção na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (DMPAG) de ratos submetidos ao teste do LCE e campo aberto. Lentes objetivas de 4X. (B) Esquema de delimitação da figura A feita de acordo com as coordenadas estereotóxicas para o cérebro de rato do Atlas de Paxinos e Watson, 1998. Legenda: DMPAG – substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; DLPAG – substância cinzenta periaquedutal dorsolateral; LPAG – substância cinzenta periaquedutal lateral; VLPAG – substância cinzenta periaquedutal ventrolateral; Aq – Aqueduto cerebral.

4.1 Experimento 1

Na figura 15 abaixo estão representados os sítios de microinjeção na SCPD de ratos submetidos ao tratamento com veículo ou agonista de receptores 5-HT₇, AS-19 nas doses de 0,05, 0,1 ou 0,2 µg. A taxa de acerto foi de 62,24%.

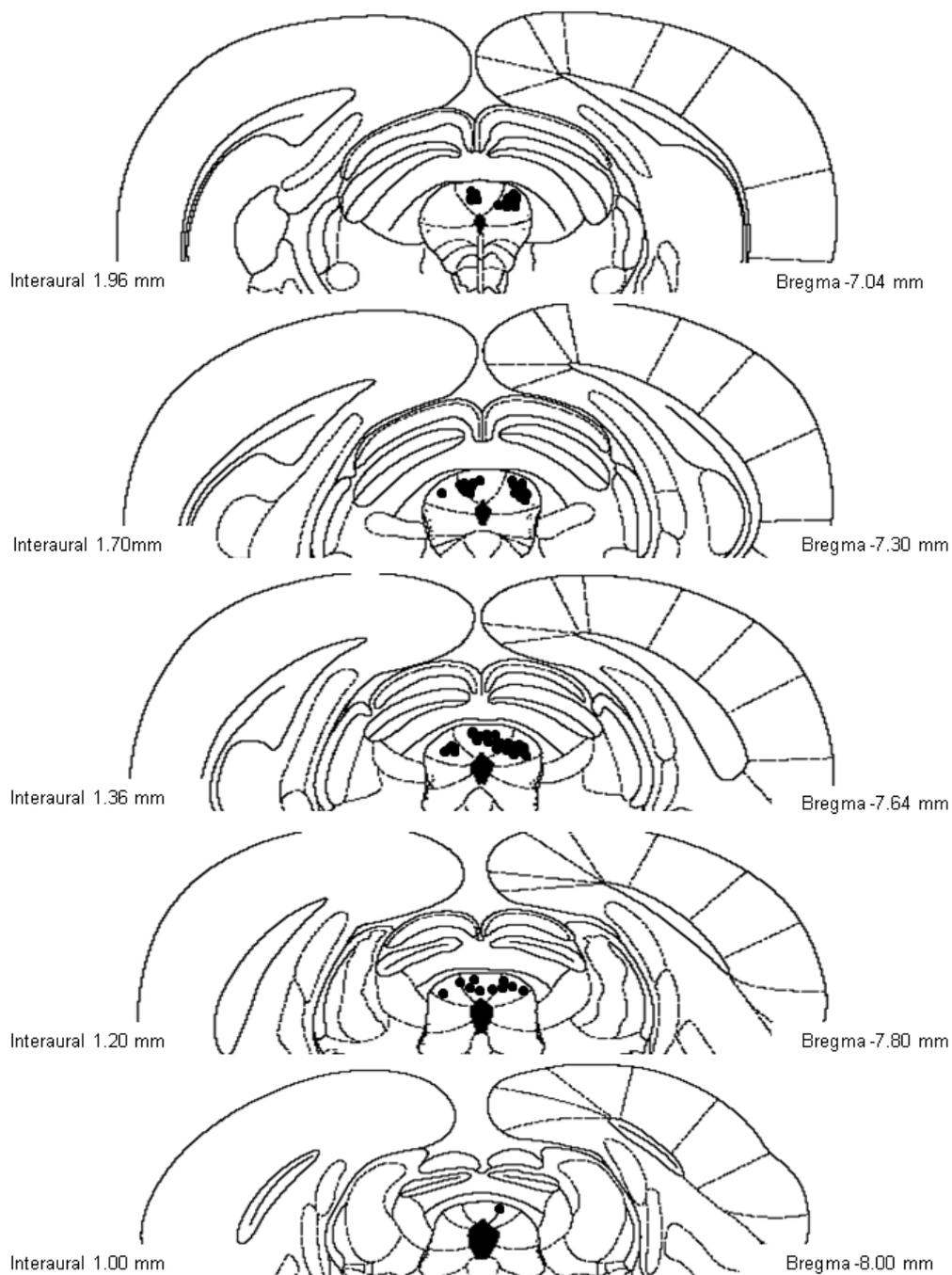


Figura 15. Representação esquemática dos sítios alvo de microinjeção de veículo ou do agonista de receptores 5-HT₇, AS-19 nas doses de 0,05, 0,1 ou 0,2 µg na SCPD de ratos submetidos ao protocolo experimental dos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto (n total = 44; n por grupo = 9-15).

4.1.1 Labirinto em Cruz Elevado

Na Figura 16 está ilustrada a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE de ratos submetidos à administração aguda intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇, AS-19 ou veículo. Houve diferença estatística entre o grupo que recebeu a dose do agonista de 0,1 µg e o grupo controle [F(3, 43) = 5,17; p = 0,004, ANOVA].

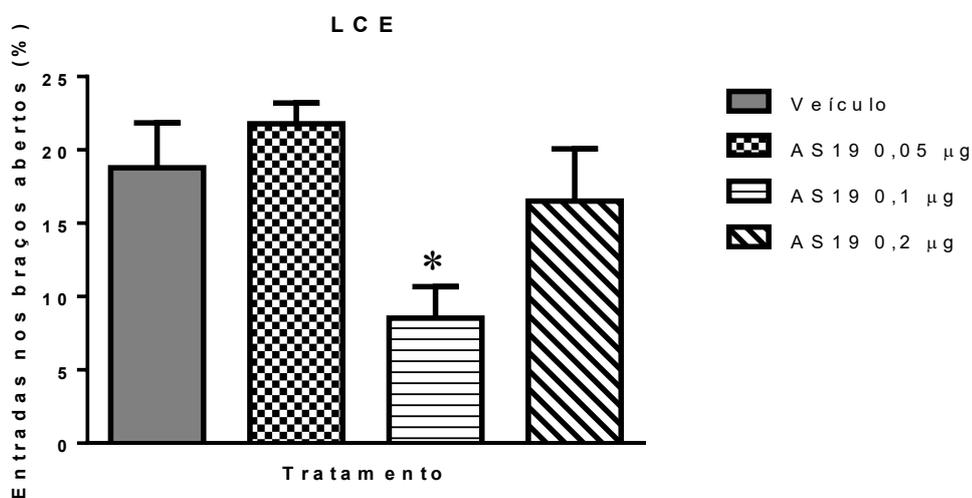


Figura 16. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 µg) sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 9-15). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo.

Em relação ao parâmetro de porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE, houve diferença significativamente estatística entre o grupo que recebeu a dose de 0,1µg e o grupo veículo [F(3, 43) = 4,68; p = 0,007, ANOVA] (Figura 17).

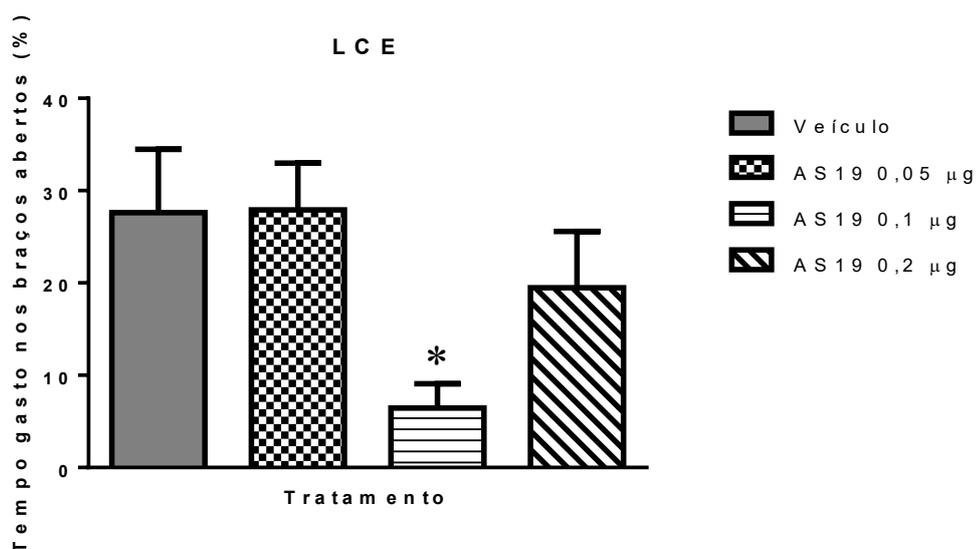


Figura 17. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 μ g) sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 9-15). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo.

Em relação aos parâmetros de número de entradas nos braços fechados [F(3, 43) = 0,38; p = 0,76, ANOVA], plataforma central [F(3, 43) = 2,14; p = 0,11, ANOVA], número de entradas totais (fechados + abertos) [F(3, 43) = 2,18; p = 0,10, ANOVA], e número de entradas totais (fechados + centro + abertos) [F(3, 43) = 2,18; p = 0,10, ANOVA], a ANOVA não mostrou qualquer diferença significativamente estatística entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito (média \pm EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 μ g) sobre o número de entradas nos braços fechados, plataforma central e no número de entradas totais, em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 9-15).

Tratamento	Entradas nos braços fechados	Entradas no centro	Entradas totais (fechados + abertos)	Entradas totais (fechados + centro + abertos)
Veículo	7,10 \pm 1,13	11,3 \pm 1,45	11,30 \pm 1,31	22,60 \pm 2,75
AS-19 0,05 μ g	6,66 \pm 0,76	12,10 \pm 1,60	12,22 \pm 1,68	24,33 \pm 3,27
AS-19 0,1 μ g	6,06 \pm 0,51	7,86 \pm 0,97	7,86 \pm 1,01	15,73 \pm 1,99
AS-19 0,2 μ g	6,10 \pm 0,86	9,80 \pm 1,51	9,90 \pm 1,51	19,70 \pm 3,02

4.1.2 Campo Aberto

Em relação aos parâmetros de atividade locomotora registrados no campo aberto, a ANOVA também não mostrou quaisquer diferenças significativamente estatísticas entre algum grupo que recebeu a dose do agonista e o grupo controle: distância percorrida total [F(3, 43) = 2,30; p = 0,09, ANOVA]; velocidade média total [F(3, 43) = 2,28; p = 0,09, ANOVA]; entradas no centro [F(3, 43) = 1,29; p = 0,28, ANOVA]; tempo gasto no centro [F(3, 43) = 1,23; p = 0,30, ANOVA]; distância percorrida no centro [F(3, 43) = 1,78; p = 0,16, ANOVA] (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,05, 0,1 e 0,2 µg) sobre as variáveis de atividade locomotora e ansiedade basal de ratos submetidos ao teste do Campo Aberto (n = 9-15).

Tratamento	Distância percorrida (m)	Velocidade média (m/s)	Entradas no centro	Tempo gasto no centro (s)	Distância percorrida no centro (m)
Veículo	16,50 ± 1,78	0,01 ± 0,00	2,90 ± 0,65	4,80 ± 0,83	0,61 ± 0,13
AS-19 0,05 µg	17,66 ± 1,81	0,01 ± 0,00	4,22 ± 0,72	5,46 ± 0,82	0,75 ± 0,13
AS-19 0,1 µg	13,71 ± 2,03	0,01 ± 0,00	4,06 ± 0,71	8,70 ± 1,41	0,68 ± 0,09
AS-19 0,2 µg	10,86 ± 1,40	0,01 ± 0,00	2,60 ± 0,61	11,02 ± 4,94	0,39 ± 0,08

4.2 Experimento 2

Na figura 18 abaixo estão representados os sítios de microinjeção na SCPD de ratos submetidos ao tratamento combinado de veículo ou do antagonista de receptores 5-HT₇, SB-269970 nas doses de 5, 10 ou 20 nmol, seguida da administração de veículo ou do agonista de receptores 5-HT₇, AS-19 na dose de 0,1 µg. A taxa de acerto foi de 76,63%.

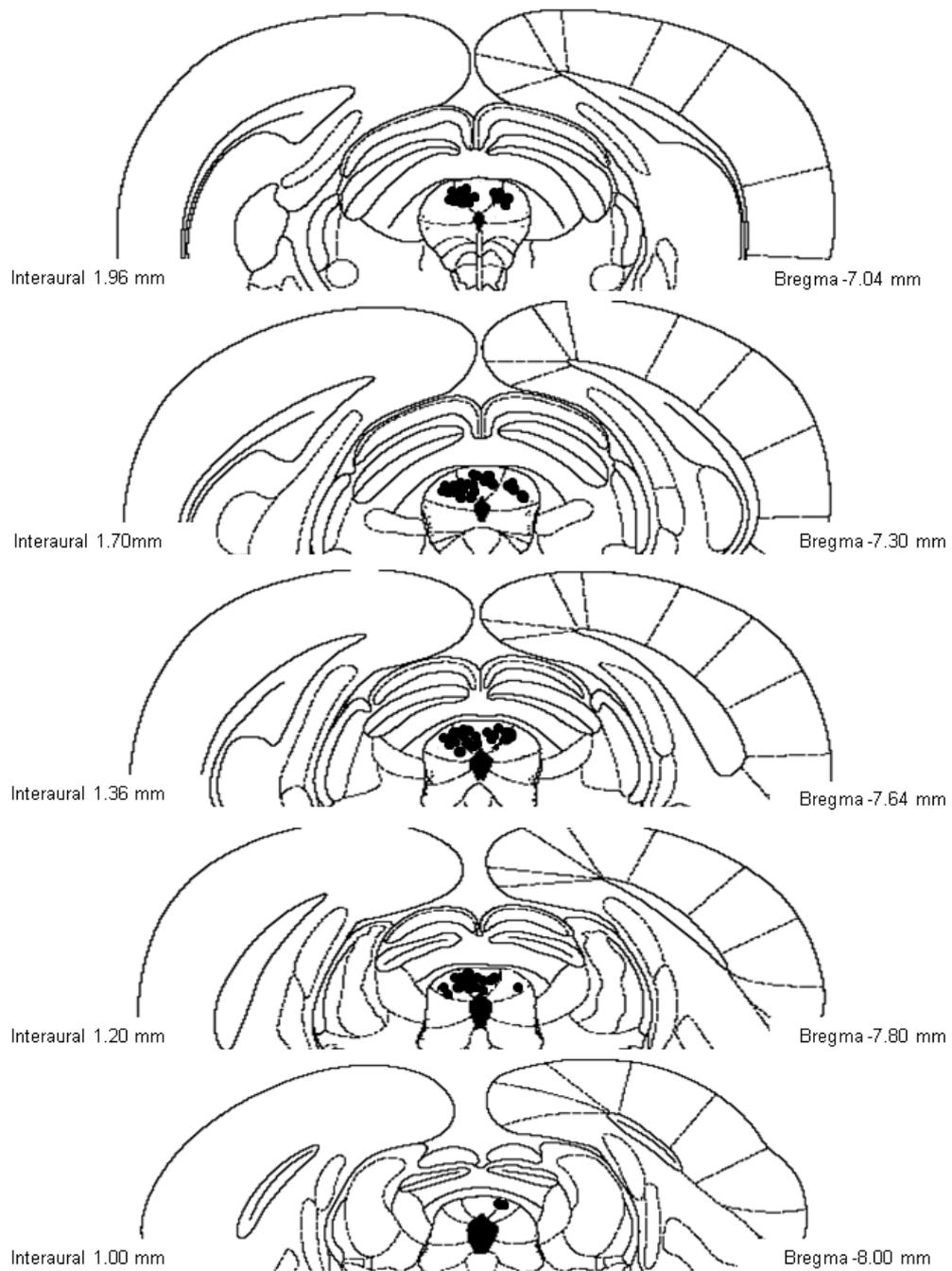


Figura 18. Representação esquemática dos sítios alvo de microinjeção de veículo ou do antagonista de receptores 5-HT₇, SB-269970 nas doses de 5, 10 ou 20 nmol, seguida da administração de veículo ou seu agonista, o AS-19 (0,1µg) na SCPD de ratos submetidos ao protocolo experimental dos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto (n total = 68; n por grupo = 7-12).

4.2.1 Labirinto em Cruz Elevado

Na Figura 19 está ilustrada a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE de ratos submetidos à administração aguda intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇, SB-269970 (5, 10 ou 20 nmol) ou veículo, seguida da administração intra-SCPD de veículo ou do agonista AS-19 (0,1µg). A ANOVA de duas vias mostrou que houve efeito do agonista, bem como da interação entre o antagonista e o agonista e o *Post Hoc* de Tukey mostrou essa diferença estatística entre o grupo que recebeu a administração do antagonista SB-269970 na dose de 20 nmol seguida do agonista AS-19 (0,1µg) [F(7, 67) = 3,57; p = 0,002, ANOVA].

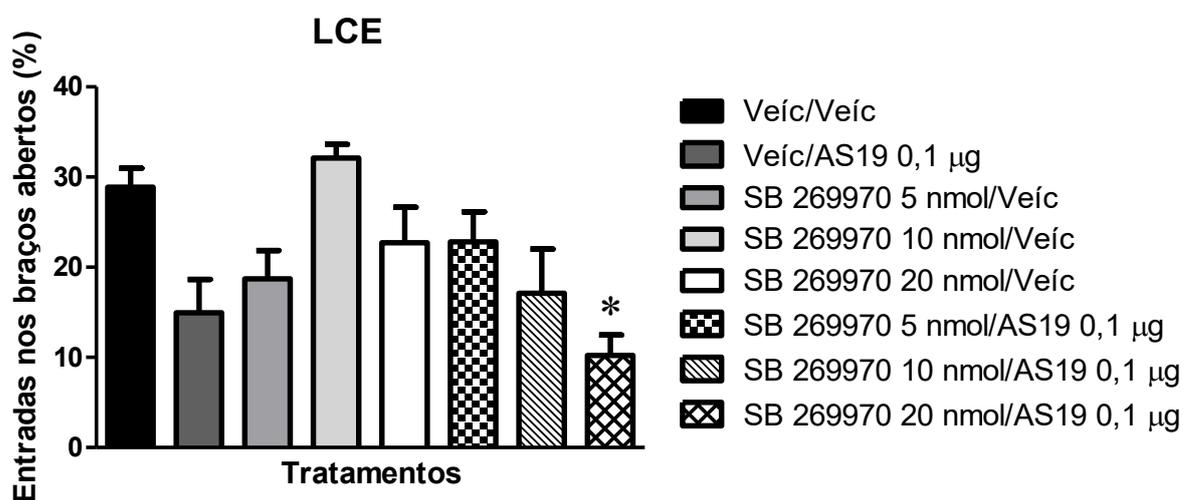


Figura 19. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇, SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,1 µg) sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 7-12). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo.

Em relação ao parâmetro de porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto (Figura 20), A ANOVA de duas vias mostrou que houve efeito do agonista, do antagonismo, assim como da interação entre eles. Comparações múltiplas do *Post hoc* de Tukey mostrou essas diferenças entre o grupo que recebeu o agonista AS-19 (0,1 µg) e o grupo controle, bem como entre o grupo que recebeu a administração do antagonista SB-269970 na dose de 10 nmol seguida da administração de veículo e o grupo controle. Além disso, houve também diferença

entre os grupos que receberam a administração do antagonista SB-269970 (10 nmol) seguida de veículo e o grupo que recebeu a administração intra-SCPD do mesmo antagonista e na mesma dose de 10 nmol, seguida da administração intra-SCPD do agonista AS-19 (0,1µg). Também houve diferença estatística entre os animais do grupo SB-269970 na dose de 20 nmol seguida da administração de veículo e o grupo controle [F(7, 67) = 7,42; p = 0,00, ANOVA].

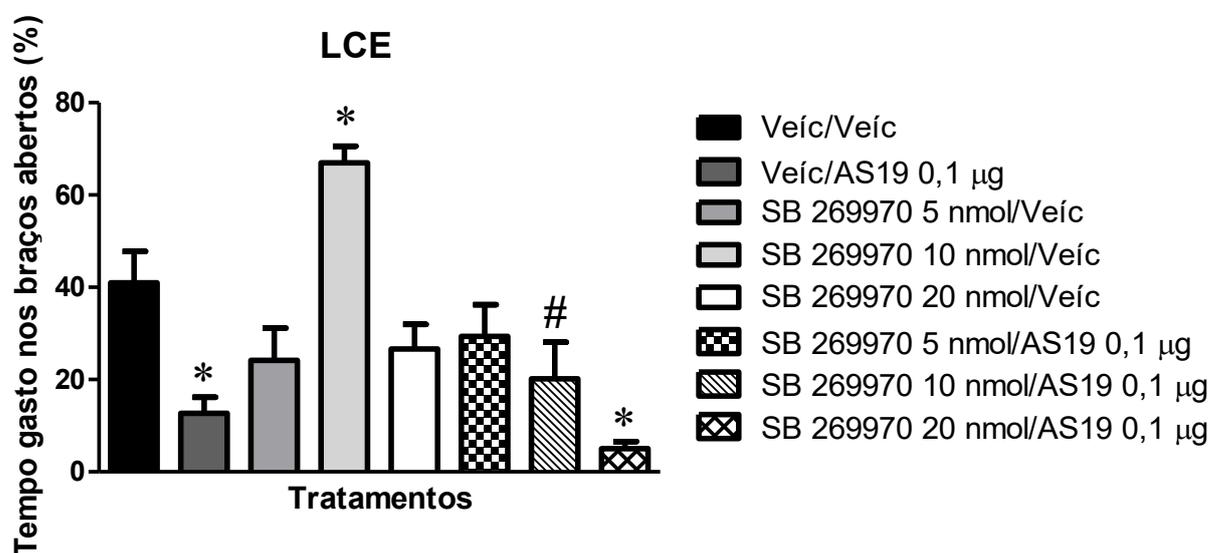


Figura 20. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇, SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,1 µg) sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 7-11). *p < 0,05 em relação ao grupo veículo/veículo; #p = 0,002 em relação ao grupo SB 269970 10 nmol/veículo.

Quanto aos parâmetros de atividade locomotora mensuradas no LCE (Tabela 3), não foram observadas diferenças significativamente estatísticas entre algum grupo experimental e o grupo controle quando analisada o parâmetro da frequência de entradas nos braços fechados do aparato [F(7, 67) = 0,83; p = 0,56, ANOVA]. No entanto, com relação às entradas totais, considerando apenas a soma das frequências de entradas nos braços fechados e abertos, foi visto que os grupos que receberam a administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 nas doses de 10 e 20 nmol seguida da administração do agonista AS-19 (0,1µg), diferiram

significativamente do grupo controle [F(7, 67) = 3,33; p = 0,005, ANOVA]. Ainda, considerando o número dessas entradas somado com a frequência na plataforma central (fechados + centro + abertos), foram observadas diferenças também entre os grupos que receberam a administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 nas doses de 10 e 20 nmol seguidos do agonista AS-19 (0,1µg) e o grupo controle total [F(7, 67) = 3,35; p = 0,004, ANOVA]. Da mesma maneira, quando observado o número de entradas apenas na plataforma central, foi visto também diferenças entre os grupos que receberam a administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 nas doses de 10 e 20 nmol seguidos do agonista AS-19 (0,1 µg) e o grupo controle total [F(7, 67) = 3,36; p = 0,004, ANOVA].

Tabela 3. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD do antagonista de receptor 5-HT₇, SB-269970 (5, 10 e 20 nmol), seguida da administração intra-SCPD do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,1 µg) sobre o número de entradas nos braços fechados, plataforma central e no número de entradas totais, em ratos submetidos ao teste do LCE (n = 7-12).

Tratamento	Entradas nos braços fechados	Entradas no centro	Entradas totais (fechados + abertos)	Entradas totais (fechados + centro + abertos)
Veíc/Veíc	6,44 ± 0,88	14,89 ± 1,12	14,88 ± 1,12	29,77 ± 2,24
Veíc/AS0,1	6,25 ± 1,35	9,75 ± 2,21	9,75 ± 2,21	19,5 ± 4,43
SB5/Veíc	6,90 ± 0,77	11,55 ± 1,17	11,72 ± 1,23	23,27 ± 2,40
SB10/Veíc	5,00 ± 0,78	13,86 ± 1,59	14,00 ± 1,73	27,85 ± 3,31
SB20/Veíc	5,00 ± 0,61	9,71 ± 1,35	9,85 ± 1,43	19,57 ± 2,79
SB5/AS0,1	5,57 ± 0,78	10,86 ± 1,03	10,57 ± 0,89	21,42 ± 1,92
SB10/AS0,1	4,75 ± 0,89	7,50 ± 1,34 ^{***}	7,41 ± 1,37 ^{***}	14,91 ± 2,70 ^{***}
SB20/AS0,1	6,28 ± 0,83	8,14 ± 1,18 [*]	8,14 ± 1,18 [*]	16,28 ± 2,36 [*]

*p < 0,05 em comparação com o grupo veículo/veículo

** p < 0,005 em comparação com o grupo veículo/veículo

p < 0,05 em comparação com o grupo SB10/Veículo

Adicionalmente, os animais do grupo que recebeu a administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 na dose de 10 nmol seguida da administração de veículo, diferiram estatisticamente do grupo de animais que receberam

administração desse mesmo antagonista na mesma dose seguida da administração intra-SCPD do agonista AS-19 (0,1µg) quando observada o número de entradas no centro e ambas as entradas totais.

4.2.2 Campo Aberto

Em relação aos parâmetros de atividade locomotora e de ansiedade experimental basal registrados na região central da arena do campo aberto (Tabela 4), a ANOVA não mostrou quaisquer diferenças significativamente estatísticas entre algum grupo experimental e o grupo controle; seja entre o grupo que recebeu o agonista seguida da administração de veículo ou quando administrado conjuntamente com o antagonista SB-269970 em alguma das doses aplicadas: distância percorrida total [F(7, 67) = 1,20; p = 0,31, ANOVA]; velocidade média [F(7, 67) = 0,72; p = 0,65, ANOVA]; entradas no centro [F(7, 67) = 1,02; p = 0,42, ANOVA]; tempo gasto no centro [F(7, 67) = 1,49; p = 0,18, ANOVA]; distância percorrida no centro [F(7, 67) = 0,75; p = 0,62, ANOVA].

Tabela 4. Efeito (média ± EPM) da administração intra-SCPD de veículo ou antagonista de receptor 5-HT₇ SB-269970 (5, 10 e 20 nmol) seguida de administração intra-SCPD de veículo ou do agonista de receptor 5-HT₇ AS-19 (0,1 µg) sobre os parâmetros de atividade locomotora e ansiedade basal de ratos submetidos ao teste do Campo Aberto (n = 7-12).

Tratamento	Distância percorrida (m)	Velocidade média (m/s)	Entradas no centro	Tempo gasto no centro (s)	Distância percorrida no centro (m)
Veíc/Veíc	10,66 ± 1,53	0,01 ± 0,00	1,55 ± 0,37	4,33 ± 1,38	0,40 ± 0,07
Veíc/AS0,1	12,09 ± 2,66	0,01 ± 0,00	4,75 ± 1,46	10,1 ± 2,71	0,88 ± 0,21
SB5/Veíc	11,23 ± 1,85	0,01 ± 0,00	3,09 ± 0,66	6,56 ± 1,74	0,55 ± 0,12
SB10/Veíc	10,78 ± 2,13	0,01 ± 0,00	3,00 ± 0,61	7,40 ± 2,95	0,52 ± 0,09
SB20/Veíc	10,11 ± 1,63	0,01 ± 0,00	6,85 ± 5,38	12,21 ± 7,61	0,97 ± 0,75
SB5/AS0,1	15,13 ± 2,70	0,01 ± 0,00	4,28 ± 0,74	13,34 ± 3,66	0,83 ± 0,31
SB10/AS0,1	15,58 ± 2,05	0,01 ± 0,00	4,66 ± 0,92	7,76 ± 2,17	0,94 ± 0,22
SB20/AS0,1	15,02 ± 1,83	0,01 ± 0,00	1,14 ± 0,40	0,90 ± 0,52	0,32 ± 0,28

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou o possível papel dos receptores 5-HT₇ presentes na SCPD na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade. Para isso, utilizou-se de um teste de medição comportamental etologicamente fundamentado, o labirinto em cruz elevado (PELLOW et al., 1985).

Inicialmente, é importante observar que, em ambos os experimentos, a administração intra-SCPD das drogas utilizadas no estudo não alterou parâmetros de locomoção clássicos, como o número de entradas nos braços fechados do LCE (tabelas 1 e 3) ou a distância percorrida no teste do campo aberto (tabelas 2 e 4), sugerindo que os efeitos comportamentais relacionados à ansiedade não estejam associados a alterações na locomoção dos animais, mesmo com a observação de que a administração intra-SCPD do agonista AS-19 na dose de 0,1 µg combinada com o antagonista SB-269970 nas doses de 10 ou 20 nmol tenha promovido efeito do tipo hipolocomotor quando considerado o número de entradas totais sejam elas com ou sem a participação do número de entradas na plataforma central do LCE.

De modo geral, estudos envolvendo a administração central de agonistas/antagonistas desse receptor são relativamente escassos. No entanto, no experimento 1 do presente estudo, foi observado que a administração intra-SCPD do agonista de receptores 5-HT₇, AS-19, na dose de 0,1 µg, mas não nas doses de 0,05 ou 2 µg, promoveu diminuição tanto na porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE como também no tempo gasto pelos animais nesses braços, o que sugere efeito do tipo ansiogênico. De maneira semelhante, este mesmo efeito também foi observado no experimento 2, onde os animais que receberam administração combinada de veículo, seguida pelo agonista AS-19 (0,1 µg), apresentaram diminuição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE, mesmo apesar de uma condição experimentalmente diferente da anterior, uma vez que nesse segundo protocolo experimental, a infusão da droga era realizada posteriormente à administração de uma substância veículo. Esse dado também corrobora com resultados prévios realizados no nosso laboratório onde a administração do antagonista SB-269970 na dose de 10 nmol na mesma estrutura encefálica – SCPD –, promoveu efeito do tipo ansiolítico, verificado pelo aumento na

porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do aparato (SILVEIRA, 2014). E, de maneira adicional a este achado, também foi visto no segundo experimento do presente estudo, que este mesmo efeito do tipo ansiolítico do antagonista SB-269970 foi reproduzido na mesma dose (10 nmol) e no mesmo parâmetro analisado, e que, a dose de 5 nmol desse antagonista preveniu o efeito do tipo ansiogênico promovido pela administração intra-SCPD do agonista AS-19.

Assim, considerando que estudos *in vitro* têm investigado e avaliado as propriedades farmacológicas do agonista AS-19, como seletividade e afinidade, apresentando uma constante de dissociação (K_i) igual a 0,6 nM para os receptores 5-HT₇ (Di PILATO et al., 2014), ao passo que o valor de p K_i (forma logarítmica negativa do K_i) para o antagonista SB-269970 foi de 8,9, que corresponde a aproximadamente 1 nM (HAGAN et al., 2000), pode-se, então, inferir-se que, tanto o antagonista SB-269970 (10 nmol) como o agonista AS-19 (0,1 µg) atuaram no receptor 5-HT₇. Ainda, pode ser proposto que essa interação com os receptores 5-HT₇ na SCPD acontece de modo que, quando ativados pelo agonista AS-19, esses receptores modulam um efeito do tipo ansiogênico e que, por outro lado, o bloqueio desses receptores favorece um efeito do tipo ansiolítico.

No segundo experimento, ainda foi visto que quando administrado nas doses de 5 e 20 nmol na SCPD dos animais, o antagonista SB-269970 não promoveu quaisquer efeitos comportamentais relacionados à ansiedade nos animais. No entanto, a dose de 0,1 µg do agonista AS-19, foi capaz de reverter os efeitos comportamentais do tipo ansiolítico promovidos pela administração do antagonista SB-269970 na dose de 10 nmol. Além disso, também foi visto que nos animais que receberam administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 na dose de 20 nmol, anterior à administração intra-SCPD do agonista AS-19 (0,1 µg), o efeito ansiogênico deste último foi mantido quando comparado ao grupo controle. Ainda, a dose de 5 nmol do antagonista SB-269970 preveniu o efeito do tipo ansiogênico do agonista AS-19 na dose de 0,1 µg.

Poucos, mas consistentes estudos na literatura científica têm investigado o papel dos receptores do tipo 5-HT₇ na ansiedade. Em um estudo realizado por Wesółowska e colaboradores (2006), os autores mostraram efeito do tipo ansiolítico em ratos submetidos à administração intrahipocampal do antagonista do receptor 5-

HT₇, SB-269970. Os animais eram submetidos aos testes do beber punido de Vogel (*Vogel drinking test*) para a posterior avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade. Os pesquisadores observaram que, quando administrado nas doses de 0,3, 1 e 3 µg, o SB-269970 mostrou um efeito anticonflito discreto nesse teste em comparação aquele promovido pela administração intrahipocampal do diazepam na dose de 40 µg. Com base nestes resultados, os autores forneceram evidências experimentais de que o hipocampo é uma das estruturas neuroanatômicas envolvidas na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade, e de maneira especial, modulados por receptores do tipo 5-HT₇ (WESOŁOWSKA et al., 2006). Além disso, em outro estudo realizado por esse mesmo grupo de pesquisa, os autores examinaram o efeito do antagonista seletivo do receptor 5-HT₇, SB 269970, em ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*. Os pesquisadores observaram que a administração periférica de forma intraperitoneal (i.p.) da droga nas doses de 0,5 ou 1 mg/kg exerceu efeito do tipo ansiolítico em ratos submetidos aos testes do beber punido de Vogel e no labirinto em cruz elevado, quando analisado o aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos, bem como a porcentagem de tempo de permanência nestes braços. Além disso, o estudo mostrou que diferenças significativas também foram vistas no teste das quatro placas (*four-plate test*) em camundongos. Ademais, apesar do potencial efeito ansiolítico da droga ter sido observado de maneira discreta, quando comparada à droga empregada como controle positivo nos testes, o diazepam, os autores concluíram que o bloqueio do receptor 5-HT₇ pode desempenhar um papel na terapia da ansiedade (WESOŁOWSKA et al., 2006).

Em concordância com os resultados acima, Mnie-Filali e colaboradores (2011) mostraram que ratos tratados agudamente com fluoxetina (10 mg/kg, i.p.), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, apresentaram redução no número de visitas na região central do campo aberto, um parâmetro também utilizado no estudo de ansiedade experimental. Nessa situação experimental, os animais recebiam a administração do fármaco uma hora antes do teste comportamental e os comportamentos relacionados à ansiedade eram observados ao longo de um período de cinco minutos numa área delimitada no aparato nas dimensões de 60 x 60 cm. Neste estudo, curiosamente, apesar de não ter apresentado efeito algum quando administrado agudamente, o antagonista SB-269970 (2 mg/kg, i.p.), foi

capaz de prevenir o efeito do tipo ansiogênico induzido pela administração da fluoxetina, levando a entender que, apesar do antagonista SB-269970 no trabalho desses autores não ter apresentado diferença significativamente estatística com o grupo controle, o possível efeito do tipo ansiolítico promovido pelo antagonista foi, indiretamente, confirmado, sobretudo por meio da modulação dos receptores 5-HT₇.

Assim, tomados juntos, esses dois últimos estudos e os resultados mostrados do presente trabalho, infere-se que, ainda que não investigado diretamente, a porção dorsal da SCP pode ser sugerida como um sítio de ação ansiolítico do SB-269970 perifericamente observados.

Curiosamente, um estudo conduzido por Adriani e colaboradores (2012), onde um dos objetivos foi o de investigar os efeitos modulatórios de dois novos agonistas do receptor 5-HT₇, LP-211 e LP-378 na emoção, mostrou que a administração aguda de LP-211 na dose de 0,25 mg/kg (i.p.), diminuiu comportamentos semelhantes à ansiedade no teste da caixa branca/preta, verificado pelo tempo gasto na zona branca da caixa, porém com aumento na atividade locomotora dos animais. Além disso, os camundongos que receberam a administração deste mesmo agonista na mesma dose acima, cinco minutos antes do teste da caixa claro/escuro, apresentaram diferenças quando comparado ao grupo controle e quando avaliada o tempo gasto na zona iluminada do aparato, sugerindo diminuição da ansiedade; e, que na dose de 0,10 mg/kg, houve uma tendência dos animais a realizarem o mesmo comportamento exploratório. Adicionalmente, a administração do agonista 5-HT₇ LP-378 (0,83 mg/kg, i.p.), também promoveu efeito do tipo ansiolítico, quando observada aumento no tempo gasto na zona clara do aparato durante o intervalo de 35 minutos de teste (ADRIANI et al., 2012).

Alguns estudos sobre ansiedade experimental no LCE analisam, além dos parâmetros clássicos supracitados, o desempenho do animal no centro do aparato (RODGERS et al., 1997; CASARRUBEA et al., 2013; CASARRUBEA et al., 2015). No nosso estudo, também foi visto que não houve diferenças significativas com relação a este parâmetro no primeiro experimento. Porém, no segundo experimento, foi visto que houve diferenças estatisticamente significativas no número de entradas na plataforma central entre os animais que receberam administração intra-SCPD de AS-19 (0,1 µg) combinada com o antagonista SB-269970 nas doses de 10 ou 20

nmol e o grupo controle. Nesse contexto, tem sido proposto que a existência da plataforma central no labirinto consiste, de certa forma, em uma oportunidade de escolha que o aparato oferece entre áreas protegidas e desprotegidas (CRUZ et al., 2010). Essa porção central tem sido frequentemente associada à tomada de decisão ou conflito de aproximação/esquiva, pois teria a inclusão do tempo gasto na plataforma central e espreita nos braços abertos, que seriam indicativos do conflito associado à situação e avaliação de risco (RODGERS, 1997; CRUZ et al., 2010).

Alguns estudos ainda contrastam com nossos resultados no que diz respeito à investigação do papel dos receptores 5-HT₇ em outros modelos experimentais de ansiedade, como o de Guscott e colaboradores (2005), que mostrou ausência de diferenças entre os camundongos *knockout* para o receptor 5-HT₇ (5-HT₇^{-/-}) e os camundongos selvagens, quando analisadas categorias comportamentais de ansiedade no LCE, como o tempo de exploração e o número de entradas nos braços abertos.

Contribuindo para essa variabilidade de resultados, um estudo conduzido por Shahidi e Hashemi-Firouzi (2013), também observou ausência de efeitos relacionados à ansiedade na manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇. Nesse estudo, os pesquisadores investigaram os efeitos da ativação e bloqueio dos receptores 5-HT₇ em comportamentos semelhantes à ansiedade relacionados à retirada de morfina. A dependência da morfina foi induzida por tratamento repetido durante o período de cinco dias e os camundongos dependentes da morfina foram pré-tratados com o agonista AS-19 (3 e 10 mg/kg, i.p.), o antagonista SB-269970 (1 e 10 mg/kg, i.p.), ou salina e subsequentemente com naloxona (3 mg/kg, s.c), um antagonista opióide, antes do teste do LCE. Os pesquisadores observaram que, em nenhum grupo experimental, a ativação ou o bloqueio dos receptores 5-HT₇ pelo AS-19 e o SB-269970, respectivamente, promoveram efeitos comportamentais relacionados à ansiedade no LCE, mostrando, assim, que o receptor 5-HT₇ parece não possuir um papel significativo em comportamentos semelhantes à ansiedade relacionados à retirada da morfina. Em contrapartida, em outro estudo recente conduzido por esses mesmos pesquisadores, e com semelhante protocolo de retirada da morfina, foi visto que os camundongos do grupo dependente de morfina que receberam administração do agonista AS-19 tiveram redução da maioria dos

sintomas da retirada, ao passo que camundongos que receberam o antagonista SB-269970 apresentaram aumento em alguns sintomas da retirada como, por exemplo, tremores de cabeça e patas, saltos, rangida de dentes e *grooming*, o que levou os pesquisadores a concluir que os receptores 5-HT₇ podem estar envolvidos nas expressões comportamentais relacionadas à retirada de morfina, de maneira que sua ativação leva à diminuição dos sintomas e seu bloqueio os favorece (SHAHIDI; HASHEMI-FIROUZI, 2014). Sendo assim, as áreas encefálicas nas quais os receptores 5-HT₇ estão presentes são de suma importância para o efeito final de sua ativação ou bloqueio.

Contribuindo com a dessemelhança dos resultados acima, e tendo em vista também a variabilidade de resultados envolvendo o antagonista SB-269970, recentes estudos tem mostrado que este antagonista pode ainda atuar como agonista inverso, bem como bloquear potencialmente receptores alfa-2 adrenérgicos (MAHE et al., 2004; LOVELL et al., 2000; FOONG et al., 2009).

Em se tratando de comportamentos defensivos gerados pela estimulação farmacológica de receptores serotoninérgicos na SCP, estudos, inclusive liderados por pesquisadores brasileiros, apontam essa participação, seja por meio da administração isolada ou combinada de antagonistas e agonistas, com vistas especiais aos receptores do tipo 5-HT_{1A}, bem como subtipos da classe 5-HT₂.

Com base no exposto acima, Zanoveli e colaboradores (2003) investigando os efeitos da administração intra-SCPD de serotonina e de três agonistas de receptores serotoninérgicos, o mCPP, agonista de receptor dos subtipos 5-HT_(2B/2C); o 8-OH-DPAT, agonista de receptor 5-HT_{1A} e o DOI, agonista preferencial de receptor 5-HT_{2A} constataram que, tanto as injeções intra-SCPD de serotonina na dose de 20 nmol, quanto as microinjeções intra-SCPD do agonista de receptores 5-HT_(2B/2C), mCPP (40 nmol), facilitaram a esquiva inibitória dos ratos no LTE, um parâmetro relacionado à ansiedade geral, sugerindo efeito do tipo ansiogênico. Em contrapartida, o agonista do receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, nas doses de 0,8, 1,6 e 3,2 nmol, diminuiu essa resposta, favorecendo efeito do tipo ansiolítico, ao passo que a administração do agonista preferencial de receptor 5-HT_{2A}, DOI não apresentou efeito. Além disso, é importante salientar que nenhuma das drogas utilizadas alterou a atividade locomotora espontânea dos animais, quando

submetidos ao teste do campo aberto, levando a entender que, semelhantemente, aos resultados do presente estudo, os efeitos relacionados à ansiedade promovidos pela ativação desses receptores na porção dorsal da SCP, parecem não decorrerem da alteração na locomoção dos animais (ZANOVELLI et al., 2003).

Subsequentemente, outro estudo de administração local na SCPD forneceu evidências adicionais para o papel dos receptores anteriormente mencionados. Conduzido por de Paula Soares e Zangrossi (2004), o trabalho revelou que ratos submetidos à administração intra-SCPD isolada do antagonista do receptor 5-HT_{1A}, WAY-100635, nas doses de 0,185, 0,37 e 0,74 nmol, bem como dos antagonistas preferenciais 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, quetanserina (5, 10 e 20 nmol) e SDZ SER 082 (5, 10 e 20 nmol), respectivamente, não alteraram os comportamentos de ratos expostos ao LTE. Entretanto, num segundo experimento, a administração intra-SCPD de quetanserina (10 nmol) e SDZ SER 082 (10 nmol), mas não de WAY-100635 (0,185, 0,37 nmol), primeiramente à administração intra-SCPD de serotonina na dose de 20 nmol, foram capazes de reverter o efeito do tipo ansiogênico causado pela administração de serotonina. Além disso, os autores também observaram que microinjeções do agonista de receptor 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, na SCPD, na dose de 3,2 nmol, diminuiu a esQUIVA inibitória, sugerindo efeito do tipo ansiolítico e que este efeito foi revertido quando o antagonista deste receptor, WAY-100635 era administrado na dose de 0,37 nmol dez minutos antes (de PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004).

Contribuindo com os resultados do estudo acima, Yamashita e colaboradores (2011) avaliaram o papel dos receptores 5-HT_{2C} na modulação das respostas defensivas promovidas pela manipulação farmacológica de receptores serotoninérgicos na SCPD de ratos. Os pesquisadores observaram que microinjeções intra-SCPD do ligante endógeno, serotonina, na dose de 20 nmol ou dos agonistas preferenciais dos receptores 5-HT_{2C}, MK-212 (1 e 10 nmol) e RO-600175 (40 nmol), aumentaram significativamente a aquisição de esQUIVA inibitória em ratos submetidos ao LTE, sugerindo efeito do tipo ansiogênico. Sendo assim, é possível sugerir que a atividade de receptores 5-HT_{1A} modulem efeitos do tipo ansiolítico, enquanto que receptores do tipo 5-HT_{2C} e 5-HT₇ na SCP modulem efeitos ansiogênicos. Inclusive, ainda que permaneça por ser investigado, receptores

5-HT₇, além dos 5-HT_{2C} na SCPD, poderiam ser sítio de ação de serotonina endógena, quando modulando a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Esses dados somados aos achados do presente estudo reforçam a hipótese de que a porção dorsal da SCP é uma estrutura que, assim como outras anteriormente estudadas, como a amígdala e o hipocampo, desempenha importante papel na aquisição de categorias comportamentais defensivas, e de maneira especial, às de ansiedade.

Recentemente, alguns estudos têm investigado a possível associação dos receptores 5-HT₇ com os da família 5-HT₁ (NAUMENKO et al., 2014). Di Pilato e colaboradores (2014), resumindo as propriedades farmacodinâmicas dos agonistas seletivos do receptor 5-HT₇, mostraram que, o agonista AS-19 apresenta valor de Ki de 0,6 nM para o receptor 5-HT₇, seguido de um Ki de 6,6 nM para o receptor 5-HT_{1D}. Logo, a farmacologia da transdução de sinal dos receptores 5-HT₇ pode ainda ser mais complexa, uma vez que tem sido demonstrado que esses receptores podem formar homodímeros entre si (TEITLER et al., 2010) ou heterodímeros com receptores 5-HT₁ (RENNER et al., 2012; NIKIFORUK, 2015). Adicionalmente, é possível inferir que a curva dose-resposta em forma de “U” para o agonista AS-19, observada no experimento 1, pode ser devida à baixa seletividade do agonista para os receptores 5-HT₇, uma vez, que se aumentarmos a dose em, pelo menos, dez vezes, este agonista poderia ativar outros receptores presentes na SCPD, como os receptores da família 5-HT₁.

Ainda, é importante salientar que a heterodimerização de receptores é um caso de particular interesse, pois pode, de maneira específica, modular as propriedades dos receptores envolvidos, levando a alterações significativas na sua farmacologia. Assim, esse fenômeno pode prover um nível adicional de controle para a regulação dos processos celulares, por meio da sinalização mediada pela ativação daquele receptor (RENNER et al., 2012), podendo, assim, anular ou mesmo potencializar o efeito do receptor em questão.

Salienta-se ainda que, a despeito dos receptores 5-HT₇ e 5-HT_{1A} compreenderem parte do grupo de receptores de serotonina acoplados à proteína G, eles possuem funções diferentes quanto à cascata de transdução intracelular. Enquanto o receptor 5-HT_{1A} é acoplado à proteína G inibitória (Gi), que quando

ativada, induz a inibição da enzima adenilato ciclase e subsequente diminuição dos níveis de cAMP, o receptor 5-HT₇ quando ativado, estimula a formação de cAMP pela ativação da proteína G estimulatória (Gs) (NORUM et al., 2003). Portanto, mesmo apesar de apresentarem mecanismos intracelulares diferentes, acumulam-se evidências para a possibilidade da interação funcional desses receptores (NAUMENKO et al., 2014; RENNERT et al., 2012) e, conseqüentemente, possíveis diferenças no espectro de respostas comportamentais nos ensaios de pesquisa básica da ansiedade. No presente estudo, sugerimos, então, que, mesmo apresentando afinidades diferentes, o agonista AS-19 e o antagonista SB-269970 atuaram sobre os receptores 5-HT₇ na SCPD, visto que a ativação de receptores 5-HT_{1A} na SCPD module efeito do tipo ansiolítico (ZANOVELI et al., 2003; De PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004).

Corroborando para esse complexo sistema neurofarmacológico, poucos, mas consistentes estudos têm mostrado a participação dos receptores 5-HT₇ na modulação da neurotransmissão GABAérgica (ROBERTS et al., 2004; TOKARSKI et al., 2011). Logo, uma vez que estudos confirmam a presença de interneurônios GABAérgicos na SCP e que cada uma dessas colunas individualmente projeta-se bilateralmente para as demais colunas dessa mesma estrutura (REICHLING; BASBAUM, 1991; KROUT; LOEWY, 2000), pode-se levantar a hipótese que a ativação ou o bloqueio desse subtipo de receptor e nessa estrutura mesencefálica, pode influenciar ou ser influenciado pelos mecanismos inibitórios desses neurônios. É plausível, então, que mais estudos de manipulação farmacológica dos receptores 5-HT₇ na SCPD devem ser realizados a fim de esclarecer mais acerca dessa interpretação. No entanto, considerando que a administração de agonistas GABAérgicos na SCPD, favorece um efeito antiaversivo (BUENO et al., 2005), provavelmente esta interação não contou para o efeito ansiogênico do agonista AS-19 do presente estudo.

Por fim, nossos resultados contribuem para a compreensão da modulação de comportamentos defensivos associados à ansiedade pela neurotransmissão serotoninérgica, ao mostrar que a ativação dos receptores 5-HT₇ presentes na SCPD por meio do agonista AS-19 favorece a expressão desses comportamentos. Já o antagonista SB-269970 favoreceu um efeito do tipo ansiolítico. Além disso,

também foi visto que quando administrado de maneira conjunta com o antagonista, o agonista reverteu o efeito ansiolítico desse último. Assim, nossos dados acrescentam evidências de que a SCPD é importante para a expressão dos comportamentos defensivos e que além dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}, receptores 5-HT₇ podem também modular respostas relacionadas à ansiedade promovidas pela exposição do animal ao teste do LCE. É importante, ressaltar, porém, que mais estudos devem ser realizados a fim de se evidenciar cada vez mais o papel desempenhado por este receptor nas expressões comportamentais de ansiedade basal focando em diferentes testes de ansiedade, na natureza da aversão gerada por estes testes, bem como no papel da SCPD na manifestação desses comportamentos. Não obstante, os resultados aqui apresentados e discutidos somar-se-ão aos de outros estudos envolvendo a participação desse subtipo de receptor como alvo de fármacos ansiolíticos.

6 CONCLUSÕES

De maneira geral, o presente trabalho objetivou investigar a possível participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 7 (5-HT₇) presentes na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade experimental. Nesse contexto, ambos objetivos específicos foram alcançados em cada experimento, corroborando com a hipótese preliminarmente levantada em outros estudos que tais receptores podem estar envolvidos nos mecanismos neurais que participam dos estados emocionais, sobretudo na ansiedade. Assim, baseado nos resultados do presente estudo é possível concluir que:

- No experimento 1, a ativação dos receptores 5-HT₇ presentes na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal, por meio da administração intra-SCPD do agonista AS-19 nas doses de 0,05 e 2 µg não promoveu efeito algum sob os comportamentos relacionados à ansiedade no LCE; no entanto, quando administrado isoladamente na dose de 0,1µg, esse mesmo agonista promoveu efeito do tipo ansiogênico, observado pela diminuição da porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE;
- No experimento 2, foi visto que a administração intra-SCPD do agonista AS-19 (0,1 µg), precedida pela administração de veículo, manteve o efeito do tipo ansiogênico no LCE, quando avaliado o parâmetro de porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do aparato;
- Ainda com relação experimento 2, a administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 (10 nmol) seguida da administração de veículo, promoveu efeito do tipo ansiolítico, quando observado o aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. Entretanto, este efeito foi revertido quando o animal recebeu, após o antagonista, a administração do agonista AS-19 (0,1 µg);
- Também foi visto no experimento 2, que o antagonista SB-269970 na dose de 5 nmol, microinjetado na SCPD, preveniu o efeito do tipo ansiogênico do agonista AS-19;

- Também foi visto no experimento 2, que os animais que receberam administração do agonista AS-19 (0,1 µg) precedida pela administração intra-SCPD do antagonista SB-269970 (20 nmol), favoreceu um efeito ansiogênico, quando comparado ao grupo controle. Este efeito foi verificado pela diminuição da porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE;
- Quanto à atividade locomotora, foi visto que, em ambos os experimentos, nenhuma das drogas administradas na SCPD alterou parâmetros clássicos de locomoção, como o número de entradas nos braços fechados do LCE ou a distância percorrida no campo aberto, levando a entender que os efeitos relacionados à ansiedade parecem não estar diretamente associados com a locomoção dos animais;
- Devido à escassez de estudos envolvendo principalmente a administração central em diferentes estruturas cerebrais e o papel desempenhado pelo receptor 5-HT₇ nessas estruturas, mais estudos da pesquisa básica são necessários para investigar a função desse receptor em comportamentos de ansiedade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANI, W.; TRAVAGLINI, D.; LACIVITA, E.; SASO, L.; LEOPOLDO, M.; LAVIOLA, G. Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 833-842, 2012.

ALLEN, A. J.; LEONARD, H.; SWEDO, S. E. Current knowledge of medications for the treatment of childhood anxiety disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 34, p. 976-86, 1995.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th ed. Washington (DC), 1994.

ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI Jr, H.; GRAEF, F. G. The median raphe nucleus in anxiety revisited. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1007-1015, 2013.

ANTLE, M. C.; OGILVIE, M. D.; PICKARD, G. E.; MISTLBERGER, R. E. Response of the mouse circadian system to serotonin 1A/2/7 agonists in vivo: surprisingly little. **Journal of Biological Rhythms**, v. 18, p. 145–148, 2003.

ASANO, Y. Characteristics of open Field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Jikken Dobutsu. Experimental Animals**, v. 35, n. 4, p. 505-508, 1986.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 179, n. 3, p. 641-667, 1978

BANDLER, R.; De PAULIS, A. The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. New York: **Plenum Press**, p. 151-73, 1991.

BANDLER, R.; PRICE, J. L.; KEAY, K. A. Brain mediation of active and passive emotional coping. **Progress in Brain Research**, vol. 122, p. 333-49, 2000.

BARD, J. A.; ZGOMBICK, J.; ADHAM, N.; VAYSSE P.; BRANCHEK, T. A.; WEINSHANK, R. L.; Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively

linked to adenylate cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 268, p. 23422–23426, 1993.

BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence 77ignalin. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, p. 35–40, 1997.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v. 46, p. 575-605, 1995.

BEITZ, A. J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 237, n. 4, p. 445–459, 1985.

BERRIOS G. E. The History of mental Symptoms. Descriptive psychopathology since the nineteenth century. Cambridge: **University Press**, 1996.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, p. 281–290, 1972.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 25, p. 205-218, 2001.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, vol. 103, n. 1, p. 70–82. 1989.

BOBILLIER, P., PETITJEAN, F., SALVERT, D., LIGIER, M.; SEGUIN, S. (1975). Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autoradiography. **Brain Research**, v. 85, n. 2, p. 205-210, 1975.

BOCKAERT, J.; CLAEYSEN, S.; BÉCAMEL, C.; DUMUIS, A.; MARIN, P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. **Cell and Tissue Research**, v. 326, n. 2, p. 553-572, 2006.

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 [³H]5-carboxamidotryptamine and [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT_{1A} knockout and 5-HT_{1A/1B} double-knockout mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 302, n. 1, p. 240-488, 2002.

BOUREUX, A.; VIGNAL, E.; FAURE, S.; FORT, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 24, n. 1, p. 203-216. 2007.

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F.; DINI, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. A. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p.93-100, 2010.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDÓSSIO, J. E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 863–875, 1999.

BRANDÃO, M. L.; VIANNA, D. M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p. 36-41, 2003.

BRANDÃO, M. L.; ZANOVELI, J. M.; RUIZ-MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA L. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioral Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 1-13. 2008.

BRENCHAT, A.; EJARQUE, M.; ZAMANILLO, D.; VELA, J. M.; ROMERO, L. Potentiation of morphine analgesia by adjuvant activation of 5-HT₇ receptors. **Journal of Pharmacological Sciences**. V. 116, p. 388–391, 2011.

BRENCHAT, A.; NADAL, X.; ROMERO, L.; OVALLE, S.; MURO, A.; SANCHEZ-ARROYOS R.; PORTILLO-SALIDO, E.; PUJOL, M.; MONTERO, A., CODONY, X.; BURGUEÑO, J.; ZAMANILLO, D.; HAMON, M.; MALDONADO, R.; VELA, J. M. Pharmacological activation of 5-HT₇ receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. **Pain**, v. 149, p. 483–494, 2010.

BRENCHAT, A.; ROCASALBAS, M.; ZAMANILLO, D.; HAMON, M.; VELA, J. M.; ROMERO, L. Assessment of 5-HT₇ Receptor Agonists Selectivity Using Nociceptive and Thermoregulation Tests in Knockout versus Wild-Type Mice. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

BRENCHAT, A.; ROMERO, L.; GARCIA, M.; PUJOL, M.; BURGUENO, J.; TORRENS, A.; HAMON, M.; BAEYENS, J.M.; BUSCHMANN, H.; ZAMANILLO, D.; VELA, J. M. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. **Pain**, v. 141, p. 239–247, 2009.

BUENO, C. H.; ZANGROSSI, H. Jr.; NOGUEIRA, R. L.; SOARES, V. P.; VIANA, M. B. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 516, n. 3, p. 239–246, 2005.

CAMPLESI, M. J. R.; De BORTOLI, V. C.; De PAULA SOARES, V.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI Jr, H. Dorsal periaqueductal gray stimulation facilitates anxiety-, but not panic-related, defensive responses in rats tested in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n.11, p. 1025-1030, 2012.

CANTERAS, N. S. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 2, p. 21-24, 2003.

CANTERAS, N. S. RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear response. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 661-668, 2001

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 481-491, 2002.

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal 79ign of rats exposed to a natural predator. **NeuroReport**, v. 10, n. 2, p. 413–418, 1999.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 27-47, 1993.

CARVALHO-NETTO, E. F. Medo e ansiedade: aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e Faculdades de Ciências Medicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 54, n. 2, p. 62-65, 2009.

CASARRUBEA, M.; FAULISI, F.; SORBERA, F.; CRESCIMANNO, G. The effects of different basal levels of anxiety on the behavioral shift analyzed in the central

platform of the elevated plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 281, p. 55–61, 2015.

CASARRUBEA, M.; ROY, V.; SORBERA, F.; MAGNUSSON, M. S.; SANTANGELO, A.; ARABO, A.; CRESCIMANNO, G. Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 290–299, 2013

CASTILLO, A. R. G. L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F. R.; MANFRO, G. G. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, p. 20-23, 2000.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001.

CIRANNA, L. CATANIA, M. V. 5-HT₇ receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: physiological role and possible implications in autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 8, p. 1-17, 2014.

CLISSOLD, K. A.; CHOI, E.; PRATT, W. E. Serotonin 1A, 1B, and 7 receptors of the rat medial nucleus accumbens differentially regulate feeding, water intake, and locomotor activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 96–103, 2013.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, v. 138, n. 1, p. 17-28, 2003.

CRUSIO, W. E.; SCHWEGLER, H.; VAN ABELEN, J. H. F. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. II. Multivariate genetic analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 32, n. 1, p. 81-88, 1989.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 171-176, 1994.

CRUZ, J. G. P.; MAGRO, D. D. D.; CRUZ, J. N. Efeitos da música clássica como elemento de enriquecimento ambiental em *Mus musculus* em cativeiro (Rodentia: Muridae). **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 191-197, 2010.

De OCA, B. M.; DECOLA, J. P.; MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Distinct Regions of the Periaqueductal Gray Are Involved in the Acquisition and Expression of Defensive Responses. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 3426–3432, 1998.

De PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI JR, H. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 64, p. 181–188, 2004.

De PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI JR, H. Stimulation of 5-HT1A or 5-HT2A receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 197, p. 178-185, 2009.

DEAN, B.; PAVEY, G.; THOMAS, D.; SCARR, E. Cortical serotonin₇, 1D and 1F receptors: effects of schizophrenia, suicide and antipsychotic drug treatment. **Schizophrenia. Research**, v. 88, p. 265–267, 2006.

Di PILATO, P.; NISO, M.; ADRIANI, W.; ROMANO, E.; TRAVAGLINI, D.; BERARDI, F.; COLABUFO, N.A.; PERRONE, R.; LAVIOLA, G.; LACIVITA, E.; LEOPOLDO, M. Selective agonists for serotonin 7 (5-HT₇) receptor and their applications in preclinical models: an overview. **Review Neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 401–415, 2014.

DIAS, B. G.; BANERJEE, S. B.; GOODMAN, J. V.; RESSLER, K. J. Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, p. 346–352, 2013.

DOGROL, A.; OSSIPOV, M. H. M.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT₃ and 5HT₇ receptors. **Brain Research**, v. 1280, p. 52–59, 2009.

DUNCAN, M.J.; GREAR, K. E.; HOSKINS, M. A. Aging and SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist, attenuate circadian phase advances induced by microinjections of serotonergic drugs in the hamster dorsal raphe nucleus. **Brain Research**, v. 1008, p. 40–48, 2004.

ETKIN, A. Functional Neuroanatomy of Anxiety: A Neural Circuit Perspective. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2, p. 251-277, 2010.

FAN, L. L.; ZHANG, Q. J.; LIU, J.; FENG, J.; GUI, Z. H.; ALI, U.; ZHANG, L.; HOU, C.; WANG, T.; HUI, Y. P.; SUN, Y. N.; WU, Z. H. In vivo effect of 5-HT₇ receptor agonist on pyramidal neurons in medial frontal cortex of normal and 6-hydroxydopamine lesioned rats: an electrophysiological study. **Neuroscience**, v. 190, p. 328–338, 2011.

FILIP, M.; BADER, M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 5, p. 761-777, 2009.

FOONG, J. P.; BORNSTEIN, J. C. 5-HT antagonists NAN-190 and SB 269970 block alpha2-adrenoceptors in the guinea pig. **Neuroreport**, v. 20, n. 3, p. 325–330, 2009.

GANNON, R. L. 5HT₇ receptors in the rodent suprachiasmatic nucleus. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 1, p. 19-24, 2001.

GELLYNCK, E.; HEYNINCK, K.; ANDRESSEN, K. W.; HAEGEMAN, G.; LEVY, F. O.; VANHOENACKER, P.; CRAENENBROECK, K. V. The serotonin 5-HT₇ receptors: two decades of research. **Experimental Brain Research**, v. 230, n. 4, p. 555–568, 2013.

GLASS, J. D.; GRASSMAN, G. H.; FARNBAUCH, L.; Di NARDO, L. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 20, p. 7451–7460, 2003.

GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1261-1269, 2009.

GORDON, J. A.; HEN, R. Genetic approaches to the study of anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p.193-222, 2004.

GRAEFF, F. G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. São Paulo: **Edusp**, 1984.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 14, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 27, n. 4, p. 811-829, 1994.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 239-259, 2004.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: **Atheneu**, v. 1, 2005.

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

GRAEFF, F. G.; SCHOENFELD, R. I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 173, n. 2, p. 277-283, 1970.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C. L.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. W. Role of the amygdala and periaqueductal 83ign in anxiety and panic. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 123-131, 1993.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI Jr, H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 207-217, 2010.

GRAY, A.; MCNAUGHTON, N. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Eds. 2 ed. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 204-32.

GREGG, T. R.; SIEGEL, A. Brain structures and 83ignaling83mitters regulating aggression in cats: implications for human aggression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 91-140, 2001.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 545-552, 2004.

GUSCOTT, M.; BRISTOW, L. J.; HADINGHAM, K.; ROSAHL, T. W.; BEER, M. S.; STANTON, J. A.; BROMIDGE, F.; OWENS, A. P.; HUSCROFT, I.; MYERS,

J.; RUPNIAK, N. M.; PATEL, S.; WHITING, P. J.; HUTSON, P. H.; FONE, K. C.; BIELLO, S. M.; KULAGOWSKI, J. J.; MCALLISTER, G. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 4, p. 492–502, 2005.

GUSCOTT, M. R.; EGAN, E.; COOK, G. P.; STANTON, J. A.; BEER, M. S.; ROSAHL, T.; HARTMANN, S.; KULAGOWSKI, J.; MCALLISTER, G.; FONE, K. C. F.; HUTSON, P. H. The hypothermic effect of 5-CT in mice is mediated by the 5-HT₇ receptor. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 1031–1037, 2003.

GUSEVA, D.; WIRTH, A.; PONIMASKIN, E. Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 306, p. 1-8, 2014.

GUSTAFSON, E. L.; DURKIN, M. M.; BARD, J. A.; ZGOMBICK, J.; BRANCHEK, T. A. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 657-666, 1996.

GUYER, A. E.; LAU, J. Y. F.; MCCLURE-TONE, E. B.; PARRISH, J.; SHIFFRIN, N. D.; REYNOLDS, R. C.; CHEN, G.; BLAIR, R. J. R.; LEIBENLUFT, E.; FOX, N. A.; ERNST, M.; PINE, D. S.; NELSON, E. E. . Amygdala and ventrolateral prefrontal cortex function during anticipated peer evaluation in pediatric social anxiety. **Archives of General Psychiatry**, v. 65, n. 11, p. 1303–1312, 2008.

HAGAN, J. J.; PRICE, G. W.; JEFFREY, P.; DEEKS, N. J.; STEAN, T.; PIPER, D.; SMITH, M. I.; UPTON, N.; MEDHURST, A. D.; MIDDLEMISS, D. N.; RILEY, G. J.; LOVELL, P. J.; BROMIDGE, S. M.; THOMAS, D. R. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 539-548, 2000.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HALL, C. S.; BALLECHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field: A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, p. 1-12, 1932

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HEDLUND, P. B.; SUTCLIFFE, J. G. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 9, p. 481–486, 2004.

HEDLUND, P. B.; SUTCLIFFE, J. G. The 5-HT₇ receptor influences stereotypic behavior in a model of obsessive-compulsive disorder. **Neuroscience Letters**, v. 414, n. 3, p. 247-251, 2007.

HEIDMANN, D. E. A.; METCALF, M. A.; KOHEN, R.; HAMBLIN, M. W. Four 5 hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 4, p. 1372–1381, 1997

HESS, W. R.; BRUGGER, M. Das subkortikale Zentrum den affektiven Abwehrreaktion. **Acta Helv Physiolo.** v. 1, p. 33-52, 1943.

HUNSPERGER, R. W. Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 14, p. 70-92, 1956.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 247-69, 2005.

JEONG, H.; LAM, K.; MITCHELL, V. A.; VAUGHAN, C. W. Serotonergic modulation of neuronal activity in rat midbrain periaqueductal gray. **Journal of Neurophysiology**, v. 109, n. 11, p. 2712-2719, 2013.

JONNAKUTY, C.; GRAGNOLI, C. What do we know about serotonin? **Journal of Cellular Physiology**. 2008; v. 217, n. 2, p. 301–306, 2008.

KAIYALAA, K. J.; VINCOWA, E. S.; SEXTONA, T. J.; NEUMAIER, J. F. 5-HT_{1B} receptor mRNA levels in dorsal raphe nucleus: inverse association with anxiety behavior in the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 4, p. 769–776, 2003.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 669-678, 2001.

KINCHESKI, G. C.; MOTA-ORTIZ, S. R.; PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. 1-14, 2012.

KITSON, S. L. 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Receptor Ligands. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2621-2637. 2007.

KROUT, K. E.; LOEWY, A. D. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. **Journal of Comparative Neurology** v. 424, n. 1, p. 111–141, 2000.

LAM, D. D.; HEISLER, L. K. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. **Expert reviews in molecular medicine**. V. 9, n. 5, p. 1-24, 2007.

LEOPOLDO, M.; LACIVITA, E.; BERARDI, F.; PERRONE, R.; HEDLUND, P. B. Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 129, p. 120–148, 2011.

LINNMAN, C.; MOULTON, E. A.; BARMETTLER, G.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. **Neuroimage**, v. 60, n. 1, p. 505-22, 2012.

LISTER, R. G. Ethological-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacological Therapy**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LITVIN, Y.; PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **Hormones and Behavior**, v. 52, p. 244–251, 2007.

LOVELL, P. J.; BROMIDGE, S. M.; DABBS, S.; DUCKWORTH, D. M.; FORBES, I. T.; JENNINGS, A. J.; KING, F. D.; MIDDLEMISS, D. N.; RAHMAN, S. K.; SAUNDERS, D. V.; COLLIN, L. L.; HAGAN, J. J.; RILEY, G. J.; THOMAS, D. R. A novel, potent, and selective 5-HT₇ antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970). **Journal of Medicine. Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 342–345, 2000.

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.; et al. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. **Neuron**, v. 11, p. 449–458, 1993.

MACEDO, C. E.; CASTILHO, V. M.; SILVA, M. A. S Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research Bulletin**, v. 59, n. 3, p. 189–195, 2002.

MAHE, C.; LOETSCHER, E.; DEV, K. K.; BOBIRNAC, I.; OTTEN, U.; SCHOEFFTER, P. Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 40–47. 2005.

MAHÉ, C.; LOETSCHER, E.; FEUERBACH, D.; MÜLLER, W.; SEILER, M. P.; SCHOEFFTER, P. Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. **European Journal of Pharmacology**. v. 495, n. 2–3, p. 97–102, 2004.

MARTÍN-CORA, F. J.; PAZOS, A. Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [3H]mesulergine: comparison to other mammalian species. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 92–104, 2004.

McNAUGHTON N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 285-305, 2004.

McNAUGHTON, N. Fear, anxiety and their disorders: past, present and future neural theories. **Psychology and Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 173 – 181, 2011.

MELTZER, H. Y.; LI, Z.; KANEDA, Y.; ICHIKAWA J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1159-1172, 2003.

MENESES, A., PEREZ-GARCIA, G., LIY-SALMERON, G., FLORES-GALVEZ, D., CASTILLO, C.; CASTILLO E. The effects of the 5-HT₆ receptor agonist EMD and the 5-HT₇ receptor agonist AS-19 on memory formation. **Behavioral Brain Research**, v.195, p. 112–119. 2008.

MEZADRI, T. J.; ORTOLAN, X. R.; THIEME, A. L.; PIACENTINI, N.; AMARAL, V. L. L. A.; FRAJBLAT, M. Avaliação do comportamento de ratos alojados em caixas de cores diferentes. **Revista de Etologia**, v. 10, n. 1, p. 21-26, 2011.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology**, v. 33, p. 55-66. 2003.

MNIE-FILALI, O.; FAURE, C.; LAMBÁS-SEÑAS, L.; EL MANSARI, M.; BELBLIDIA, H.; GONDARD, E.; ETIÉVANT, A.; SCARNA, H.; DIDIER, A.; BEROD, A.; BLIER, P.; HADDJERI, N. Pharmacological blockade of 5-HT₇ receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1275-88, 2011.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

MONTI, J. M. The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons. And of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. **Sleep Medicine Reviews**, v. 14, p. 319–327, 2010.

MONTI, J. M.; JANTOS, H. The role of serotonin 5-HT₇ receptor in regulating sleep and wakefulness. **Reviews in the neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 429–437, 2014.

MORAES, C. L.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 181–186, 2008.

MUNEOKA, K. T.; TAKIGAWA, M. 5-Hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, p. 133–143, 2003.

MYERS-SCHULZ, B.; KOENIGS, M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 17, p. 132-141, 2012.

NARDI, A. E.; FONTENELLE, L. F.; CRIPPA, J. A. S. New trends in anxiety disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 1, p. 5-6, 2012.

NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 14-24, 1969.

NAUMENKO, V. S.; POPOVA, N. K.; LACIVITA, E.; LEOPOLDO, M.; PONIMASKIN, E. G. Interplay between Serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ Receptors in

Depressive Disorders **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 20, n. 7, p. 582-590, 2014.

NIKIFORUK, A. Targeting the Serotonin 5-HT₇ Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders: Rationale and Progress to Date. **CNS Drugs**, v. 29, n. 4, p. 265-275, 2015.

NOBRE, M. J.; CABRAL, A.; BRANDÃO, M. L. GABAergic regulation of auditory sensory gating in low- and high-anxiety rats submitted to a fear conditioning procedure. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1152-1163, 2010.

NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT Receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. **Pharmacology Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 1995.

NORUM, J. H.; HART, K.; LEVY, F. O. Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT₄(b) and 5-HT₇(a). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 3098-3104, 2003.

NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behavioural Brain Research** v. 187, n. 1, p. 72-79, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Sidney: Academic Press**, 3 ed, 1998.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PEREZ-GARCIA, G. S.; MENESES, A. Effects of the potential 5-HT₇ receptor agonist AS-19 in an autoshaping learning task. **Behavioral Brain Research**, v. 163, p. 136-140. 2005.

PIRES, G. N.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Relação entre privação de sono e ansiedade na pesquisa básica. **Einstein**, v. 10, n. 4, p. 519-523, 2012.

PLASSAT, J. L.; AMLAIKY, N.; HEN, R. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 229–236, 1993.

POBBE, R. L. H.; ZANGROSSI JR, H.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 306–315, 2011.

PYTIAK, M.; VARGOVÁ, V.; MECHÍROVÁ, V.; FELŠÖCI, M. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. **Physiological Research**, v. 60, p. 15-25, 2011.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W.; MULLER, C. J. T.; BARNABÉ, C. S.; ROSA, C. A.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally- isolated adult rats. **Plos One**, v. 9, n. 3, 2014.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor (serotonin): IV. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, p. 1243-1251, 1948.

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER, J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T. W.; GREWAL, J. S.; GARNOVSKAYA, M. N. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 2-3, p. 179-212, 2001.

REICHLING, D. B.; BASBAUM, A. Collateralization of periaqueductal gray neurons to forebrain or diencephalon and to the medullary nucleus raphe magnus in the rat. **Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 183-200, 1991.

RENNER, U.; ZEUG, A.; WOEHLE, A.; NIEBERT, M.; DITYATEV, A.; DITYATEVA, G.; GORINSKI, N.; GUSEVA, D.; ABDEL-GALIL, D.; FROHLICH, M.; DORING, F.; WISCHMEYER, E.; RICHTER, D. W.; NEHER, E.; PONIMASKIN, E. G. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signaling and trafficking. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 2486–2499, 2012.

ROBERTS, A. J.; KRUCKER, T.; LEVY, C. L.; SLANINA, K. A.; SUTCLIFFE, J. G.; HEDLUND, P. B. Mice lacking 5-HT₇ receptors show specific impairments in

contextual learning. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 1913-1922, 2004.

RODGERS, R. J.; CAO, G. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 30 n. 3, p. 289-304, 1997.

RUAT, M.; TRAIFFORT, E.; LEURS, R.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; DIAZ, J.; ARRANG, J. M.; SCHWARTZ, J. C. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT7) activating Camp formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 90, p. 8547–855, 1993.

RUSSO, A.; PELLITTERI, R.; MONACO, S.; ROMEO, R.; ANDSTANZANI, S. “In vitro” post natal expression of 5-HT7 receptors in the rat hypothalamus: an immunohistochemical analysis. **Developmental Brain Research**, v. 154, n. 2, p. 211–216, 2005.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Strain Differences in Open-Field and Elevated Plus-Maze Behavior of Rats Without and With Pretest Handling. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol. 59, n. 4, p. 807–811, 1998.

SHAHIDI, S.; HASHEMI-FIROUZI, N. Role of 5-HT7 Receptors in the Anxiety-Like Behavior in Naloxone-Induced Withdrawal Symptoms in Mice. **Neurochemical Journal**, v. 7, n. 4, p. 308–312, 2013.

SHAHIDI, S.; HASHEMI-FIROUZI, N. The effects of a 5-HT7 receptor agonist and antagonist on morphine withdrawal syndrome in mice. **Neuroscience Letters**, v. 578, n. 22, p. 27-32, 2014.

SHAIKH, M. B.; De LANEROLLE, N. C.; SIEGEL, A. Serotonin 5-HT1A and 5-HT2/1C receptors in the midbrain periaqueductal gray differentially modulate defensive rage behavior elicited from the medial hypothalamus of the cat. **Brain Research**, v. 765, n. 2, p. 198-207, 1997.

SILVEIRA, M. A. **O antagonismo do receptor de serotonina do tipo 7 da substância cinzenta periaqueductal dorsal reduz a ansiedade experimental basal, mas não aquela gerada pela retirada do etanol em ratos.** 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2014.

STAHL, S. M. Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 3 ed, 2011.

SWEDO, S. E.; LEONARD, H. L.; ALLEN, A. J. New developments in childhood affective and anxiety disorders. **Current Problems in Pediatrics**, v. 24, p. 12-38, 1994.

TEITLER, M.; TOOHEY, N.; KNIGHT, J. A.; KLEIN, M. T.; SMITH, C. Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone-inactivated h5-HT7 receptors: radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions. **Psychopharmacology**, v. 212, n. 4, p. 687-697, 2010.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 4, p. 571-576, 2000.

TERRÓN J. A.; FALCÓN-NERI, A. Pharmacological evidence for the 5-HT7 receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. **British Journal of Pharmacology**. v. 127, n. 3, p. 609-16, 1999.

THOMAS, D. R.; HAGAN, J. J. 5-HT7 receptors. **Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders**, v. 3, n. 1, p. 81-90, 2004.

THOMAS, D. R.; MELOTTO, S.; MASSAGRANDE, M.; GRIBBLE, A.D.; JEFFREY, P.; STEVENS, A. J.; DEEKS, N. J.; EDDERSHAW, P. J.; FENWICK, S. H.; RILEY, G.; STEAN, T.; SCOTT, C. M.; HILL, M. J.; MIDDLEMISS, D. N.; HAGAN, J. J.; PRICE, G. W.; FORBES, I. T. SB-656104-A, a novel selective 5-HT7 receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 4, p. 705-714. 2003.

TOKARSKI, K.; KUSEK, M.; HESS, G. 5-HT7 receptors modulate gabaergic transmission in rat hippocampal ca1 area. **Journal of Physiology And Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 535-540, 2011.

TOKARSKI, K.; KUSEK, M.; SOWA, J.; BOBULA, B. Possible involvement of 5-HT₇ receptor in pathophysiology of affective disorders and action of antidepressant drugs. **Advances in Hygiene and Experimental Medicine**, v. 68, p. 1104-1113, 2014.

TORRES, C.; ESCARABAJAL, M. D. Validation of a behavioral recording automated system in the elevated plus-maze test. **Life Sciences**., v. 70, n. 15, p. 1751-1762, 2002.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, n. 2., p. 203-222, 1985.

TSOU, A.P.; KOSAKA, A.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; YEE, C.; TOM, L.; ALVAREZ, R.; RAMSEY, S.; BONHAUS, D. W.; STEFANICH, E.; JAKEMAN, L.; EGLIN, R. M.; CHAN, H. W. Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylyl cyclase. **Journal of Neurochemistry**, v. 63, n. 2, p. 456–464, 1994.

VIANA, M. D. B.; TOMAZ, C. A. B.; GRAEFF, F. G. The elevated t-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 549-554, 1994.

VIANNA, D. M. L.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 557-566, 2003.

VIANNA, D. M. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 711-719, 2001.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: A Critical Review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WENNERBERG, K.; DER, C. J. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1301-1312, 2004.

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

WESOŁOWSKA, A.; NIKIFORUK, A.; STACHOWICZ, K.; TATARCZYŃSKA, E. Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 3, p. 578-86, 2006b.

YAMASHITA, P. S.; DE BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H. Jr. 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal Gray. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2-3, p. 216-22, 2011.

ZANGROSSI, Jr., H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in Anxiety and Panic: Contributions of the Elevated T-Maze. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 397-406, 2014.

ZANGROSSI, Jr., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, p. 1-5, 1997.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 473, n. 2-3, p.153-161, 2003.

ANEXO



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 029/2012

Professor/Pesquisador: *VANESSA DE PAULA SOARES RACHETTI*

Natal (RN), 30 de junho de 2012.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o parecer emitido pela CEUA a respeito do projeto "INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES DO TIPO 5-HT7 DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE E À DEPRESSÃO CAUSADOS PELA RETIRADA DO ETANOL", protocolo nº 029/2012, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regulamento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: MAIO 2014 (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,


Elaine C. Gavioli
Coordenadora da CEUA