

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

FLÁVIA ROBERTA CHAVES SOARES

**O PAPEL DA GALANINA NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE  
EXPERIMENTAL MEDIADA PELA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL DORSAL (MCPD) DE RATOS**

VITÓRIA  
2014

FLÁVIA ROBERTA CHAVES SOARES

**O PAPEL DA GALANINA NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE  
EXPERIMENTAL MEDIADA PELA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL DORSAL (MCPD) DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Beijamini Harres

VITÓRIA  
2014

FLÁVIA ROBERTA CHAVES SOARES

**O PAPEL DA GALANINA NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE  
EXPERIMENTAL MEDIADA PELA MATÉRIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTAL DORSAL (MCPD) DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 18 de julho de 2014.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Beijamini Harres  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquíria Camin de Bortoli  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele Cristina de Aguiar  
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho aos meus pais,  
o amor de onde tudo começou.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres, pela sua excelente orientação, por partilhar todo seu conhecimento de forma gratuita, pela sua competência e comprometimento na realização desse projeto em especial, por dividir suas experiências profissionais e pessoais conosco, o que contribuiu muito para meu crescimento não só profissional, mas também pessoal.

Aos professores que compuseram a banca de avaliação desse trabalho, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Cristina de Aguiar e Prof.<sup>a</sup> Valquíria Camin de Bortoli pela disponibilidade em ajudar e pelas excelentes e importantes contribuições na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia por todo conhecimento partilhado que permitiu meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg, coordenador do PRONEX, que viabilizou a execução desse trabalho.

À doutoranda Claudia Janaína Torres Muller, por dividir seu conhecimento e experiência.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Cristina de Aguiar e sua aluna doutoranda Ana Flávia Almeida pelo carinho que tiveram comigo durante minha passagem pela UFMG, e por partilharem conhecimentos e experiência.

Aos colegas de laboratório Gabriela, Mayara, Juliana, Thuani, e mais tarde Cristina, Johnathan e Alciene, pela amizade, pelas conversas jogadas fora, pelas grandes ajudas, só vocês sabem como foram grandes, enfim vocês foram peças fundamentais para a realização desse trabalho.

À Ju novamente, pela amizade que surgiu de forma inesperada, mas que cresceu na nossa vivência intensa, pelo exemplo de determinação e pelo apoio que foi fundamental para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos Alexandre e Andreia, pelos momentos de descontração, pelos ouvidos nas horas de aperto, pelo carinho e apoio que me ajudaram a acreditar mais em mim.

Aos amigos da pós-graduação, pela amizade e companheirismo ao longo dessa jornada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos meus avós, D. Miquita e Sr. Itamar que sempre desejaram me ver morando em Vila Velha, pela acolhida sempre carinhosa, pelo exemplo que são, pela paciência, e por sempre me apoiarem nos estudos.

À Tia Rose, Tio Eduardo, Duda e Léo, pelo apoio e carinho durante esses dois anos, pelos filmes “não completamente assistidos”, por renovarem minhas energias, com vocês me sentia menos longe de casa.

À minha amiga-irmã Tatá, pelo alto astral que me coloca pra cima quando os dias são “bads”, por ser um exemplo de autoestima, e pela paciência durante essa convivência intensa.

Ao meu anjo André, meu em breve marido, que vem dividindo comigo sonhos e projetos, pelos desafios vencidos ao longo dessa jornada, por me fazer um ser-humano melhor, pela gratuidade em me ajudar sempre, e por esse sentimento bom que vem crescendo a cada dia.

À minha futura família, Lúcia, Júlia e Murilo, pelo carinho durante essa vivência mais próxima, que me ajudava a renovar as energias.

À Rafa e à Roma pela fé que sempre depositaram em mim, pelo amor e amizade que nos torna parte de uma criação indivisível, sou mais completa quando estou com vocês.

Ao meu cunhado Peri, pela amizade e por acreditar na minha competência, pelo amor que tem pela minha irmã Rafa que gerou um amor maior, meu primeiro sobrinho, o Luquinhas.

Aos meus pais, não sei se existem palavras para agradecê-los, cada um à sua maneira acreditou em mim e juntos me permitiram chegar até aqui, vocês são eternamente meus ídolos.

Por fim, à Ele que me concedeu a vida, que permitiu conhecer todas as pessoas anteriormente agradecidas, Ele que me quer um ser-humano melhor a cada dia, e que me ensina lições de amor a cada nascer do sol.

*A sabedoria carece de dor para  
crescer.*

Pe. Fábio de Melo

## RESUMO

A galanina (GAL) é um peptídeo composto por 29 aminoácidos que está presente no SNC de inúmeros mamíferos, inclusive do homem. A distribuição da GAL e de seus receptores em estruturas envolvidas com o controle das emoções apontam para um possível papel modulatório desse neuropeptídeo sobre a ansiedade. A Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPD) é considerada uma estrutura-chave para a expressão comportamental e autonômica do comportamento defensivo. Entretanto, o papel da GAL nessa estrutura ainda não foi estudado. A MCPD recebe projeções galaninérgicas de outras estruturas, mas não sintetiza o peptídeo em seus corpos celulares. Foram clonados 3 diferentes receptores para a GAL, GALR1 e GALR3, que aumentam o efluxo de  $K^+$ , e GALR2, que aumenta a concentração intracelular de  $Ca^{++}$ . Estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* descreveram a presença do GALR1 e do GALR2 na MCPD, embora o GALR1 apareça em maior número. O objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento da GAL sobre a modulação da ansiedade experimental mediada pela MCPD de ratos. Para tanto, foi realizada cirurgia estereotáxica em ratos Wistar adultos para implantação unilateral de uma cânula-guia na MCPD (AP-lambda: 0 mm; L: 2,0 mm; e P: 4,0 mm, 15°), por onde as seguintes drogas foram administradas: GAL (0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/ 0,2µL), M617 - agonista seletivo GalR1 (0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/ 0,2µL) e AR-M1896 – agonista seletivo GalR2 (0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/ 0,2µL). Passados 5-7 dias de recuperação, cada animal recebeu a injeção de droga e 20 min. após foi submetido aos testes do LCE, LTE e Vogel. Grupos independentes de animais (n= 5-12) foram usados em cada experimento. A GAL, e os ligantes seletivos M617 e AR-M1896, nas diferentes doses testadas, não alteraram de modo significativo os parâmetros porcentagem de entrada e porcentagem de tempo nos braços abertos (BAs) do LCE. Os resultados mostraram que o tratamento com a GAL (3,0 nmoles) prejudicou a Esquiva 2 de modo significativo, sem alterar a fuga. O tratamento agudo com a GAL não alterou a atividade locomotora verificada no Campo Aberto. E por fim, a GAL (1,0 e 3,0 nmoles) não apresentou diferença para o número de lambidas punidas no Teste do Conflito de Vogel em comparação ao grupo controle. Dessa forma, o efeito tipo-ansiolítico da GAL mediado pela MCPD parece depender do modelo experimental empregado e dos níveis de ansiedade gerados pelo mesmo.

Palavras-chave: Galanina. MCPD. Ansiedade. LTE.

## ABSTRACT

Galanin (GAL) is a 29 amino acids peptide that is present in the CNS of many mammals, including human being. The distribution of GAL and its receptors in emotions control structures involved suggests a possible modulatory role of this neuropeptide on anxiety. The dorsal periaqueductal gray (DPAG) is considered a key structure for behavioral and autonomic expression of defensive behavior. However, the role of GAL in this region has not been studied. The DPAG receives galaninergic projections from other structures, but does not synthesize the peptide on their cell bodies. GAL's actions are mediated by 3 metabotropic receptors, GALR1 and GALR3, which increase K<sup>+</sup> efflux, and GALR2, which increases Ca<sup>2+</sup> intracellular concentration. Using in situ hybridization technique was described the presence of GALR1 and GalR2 receptors in rat DPAG neurons, but there is GALR1 in greater density. The aim of this study was to investigate the involvement of GAL on the modulation of experimental anxiety by DPAG in rats. Therefore, Wistar rats with a unilateral cannula aimed at the DPAG (AP-lambda: 0 mm; L: 2.0 mm; e P: 4.0 mm, 15°), where the drugs were administered, received the following drugs: GAL (0.1; 0.3; 1.0 e 3.0 nmol/ 0.2µL), M617 – selective agonist GALR1 (0.3; 1.0 e 3.0 nmol/ 0.2µL) e AR-M1896 – selective agonist GALR2 (0.3; 1.0 e 3.0 nmol/ 0.2µL). After 5-7 days of recovery, each animal received an injection of drug and tests were carried-out in the plus-maze, elevated T-maze (ETM) or Vogel Test 20 min later. Each experiment was conducted with separated groups of animals (n=5-12). Tests performed at plus-maze after injection of GAL or selective agonists M617 and AR-M1896 into-DPAG did not change percentage of entries and percentage of time spent in the open arms. The analysis showed that treatment with GAL (3 nmol) significantly impaired Avoidance 2 in the ETM, without change Escape behavior. Acute treatment with GAL did not change locomotion in the Open Field. Finally, GAL (1.0 e 3.0 nmol) did not show difference in the number of punished licks at Conflict Vogel Test in comparison with control group. Thus, the anxiolytic effect of GAL in the DPAG seems to depend on the experimental model of anxiety employee and anxiety level generated by them. Key-words: Galanin. DPAG. Anxiety. T-maze.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos principais grupos de células imunorreativas para GAL no SNC de ratos.....	<b>16</b>
<b>Figura 2</b> - Distribuição do RNAm para GALR1 e GALR2 na MCP de ratos.....	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> - Diferentes vias de sinalização para os três subtipos de receptores descritos para GAL.....	<b>19</b>
<b>Figura 4</b> - Foto do aparelho utilizado para os testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	<b>34</b>
<b>Figura 5</b> - Foto ilustrativa do aparelho utilizado para os testes do Campo Aberto....	<b>37</b>
<b>Figura 6</b> - Desenho esquemático do aparelho utilizado para o Teste de Conflito de Vogel (TCV).....	<b>38</b>
<b>Figura 7</b> - Representação dos sítios de injeção na MCP de ratos testados no LTE.	<b>42</b>
<b>Figura 8</b> - Resultados para a GAL intra-MCPD de ratos testados no LCE .....	<b>43</b>
<b>Figura 9</b> - Resultados para o M617 intra-MCPD de ratos testados no LCE .....	<b>44</b>
<b>Figura 10</b> - Resultados para o AR-M1896 intra-MCPD de ratos testados no LCE ...	<b>45</b>
<b>Figura 11</b> - Resultados para a GAL intra-MCPD de ratos testados no LTE. ....	<b>47</b>
<b>Figura 12</b> - Resultados para a GAL intra-MCPD de ratos testados no TCV .....	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACe** - amígdala central

**AP7** - ácido DL-2-amino-7-fosfoetanóico

**BA** - braço aberto

**BF** - braço fechado

**BNST** - núcleo do leito da estria terminal

**CA** - Campo Aberto

**CRH** - Hormônio Liberador de Corticotropina

**DSM-5** - Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (5ª ed.; DSM-5; Associação Psiquiátrica Americana, 2013)

**GABA** - ácido amino-gama-butírico

**GAL** - galanina

**GLU** - glutamato

**HHA** - hipotálamo-hipófise-adrenal

**i.c.v.** - intra-cérebro-ventricular

**i.p.** - intraperitoneal

**ISRSs** - Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

**LC** - locus coeruleus

**LCE** - labirinto em cruz elevado

**LTE** - labirinto em T elevado

**MCPD** - Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal

**NDR** - núcleo dorsal da rafe

**NMDA** - ácido N-metil-D-aspártico

**NOS** - Óxido Nítrico Sintase

**pCREB** - monofosfato de adenosina cíclica fosforilado

**SL** - Septo Lateral

**SNC** - sistema nervoso central

**TAG** - Transtorno de Ansiedade Generalizada

**TCV** - Teste de Conflito de Vogel

**TNF** - Teste do Nado Forçado

**TP** - Transtorno de Pânico

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 ANSIEDADE.....	13
1.2 GALANINA.....	15
1.3 MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (MCP) .....	21
1.4 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE .....	24
1.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	25
1.4.2 Labirinto em T Elevado (LTE) .....	27
1.4.3 Teste de Conflito de Vogel (TCV) .....	27
1.5 HIPÓTESE.....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 DROGAS .....	31
3.3 IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA .....	32
3.4 INJEÇÃO E HISTOLOGIA .....	32
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	33
3.5.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	33
3.5.2 Labirinto em T Elevado (LTE) .....	34
3.5.3 CAMPO ABERTO (CA).....	36
3.5.4 Teste de Conflito de Vogel (TCV) .....	37
3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS .....	39
3.6.1 EXPERIMENTO 1 - Efeito da GAL intra-MCPD, nas doses de 0,1, 0,3 e 1,0 nmol/0,2 µL, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LCE.....	39

3.6.2	EXPERIMENTO 2 - Efeito do M617 e do AR-M1896 intra-MCPD, nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0 nmoles/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LCE .....	39
3.6.3	EXPERIMENTO 3 - Efeito da GAL intra-MCPD, nas doses de 1,0 e 3,0 nmoleses/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LTE .....	40
3.6.4	EXPERIMENTO 4 - Efeito da GAL intra-MCPD, nas doses de 1,0 e 3,0 nmoleses/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao TCV .....	40
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ANSIEDADE

A ansiedade é entendida como uma mudança de estado fisiológico, psicológico e comportamental devido a uma ameaça do bem-estar ou sobrevivência, que ocorre em animais e humanos. A ansiedade prepara o indivíduo para o enfrentamento de situações ameaçadoras. Faz-se necessário distinguir o medo, que é definido como resposta a um objeto de ameaça próximo e real, da ansiedade, a qual se caracteriza pela resposta a uma ameaça em potencial (STEIMER, 2002).

Do ponto de vista fisiológico é caracterizada por uma ativação autonômica e neuroendócrina. Ocorre então, ativação do sistema simpático, com o aumento da frequência e da força de contração do coração, o que o indivíduo muitas vezes descreve como palpitações, podendo apresentar ainda tremor e sudorese. A respiração também fica prejudicada, com sensação de falta de ar. Pode haver ativação parassimpática também, com hipersecreção gástrica, levando até mesmo ao surgimento de patologias paralelas à ansiedade (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012).

Num âmbito geral, o estado de ansiedade é fruto de situações estressantes que acarretam alterações hormonais por um desequilíbrio na ativação do eixo HPA (hipófise-pituitária-adrenal). Neurônios do hipotálamo aumentam a secreção do Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) que culmina no aumento dos índices sanguíneos de cortisol (em humanos) e demais corticoides produzidos pelas suprarrenais (GRAEFF, 2007).

Estudo realizado no início do século XX mostrou que há relação direta entre nível de ansiedade e o desempenho em tarefas intelectuais. Entretanto, a partir de um patamar, observa-se comprometimento do desempenho devido a níveis muito elevados de ansiedade, o que representa um fenômeno de má adaptação. Acredita-

se que quando a ansiedade perde sua função adaptativa original, passando a prejudicar o indivíduo, ela pode ser considerada como patologia funcional em si (DRACU & LADER, 1993).

Motivo de discussões para filósofos e pensadores desde a Antiguidade, a ansiedade é há muito tempo tema de estudo. Teve grande importância nos estudos de Psiquiatria realizados por Sigmund Freud, e chega aos dias de hoje com critérios de diagnóstico cada vez mais elaborados, porém não seguramente definidos, dado o caráter muito subjetivo desta patologia (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012). A classificação mais atual dos Transtornos de Ansiedade é a encontrada no Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (5ª ed.; DSM-5; Associação Psiquiátrica Americana, 2013). No capítulo de Transtornos de Ansiedade estão agrupadas as patologias que dividem características tais como medo excessivo e ansiedade, e que se assemelham em suas alterações comportamentais. Dentre elas se destacam o Transtorno de Pânico (TP) e o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG). A 5ª edição deste manual, diferentemente de suas versões anteriores, separou em capítulos específicos a caracterização dos Transtornos Obsessivos Compulsivos e Relacionados, e os Transtornos Relacionados ao Estresse e Traumas. Contudo, dada à relação próxima entre tais patologias, foi conservada também a proximidade de localização na construção do Manual (Associação Psiquiátrica Americana, 2013).

O TP é marcado por ataques de pânico recorrentes e inesperados, gerando preocupação persistente no indivíduo. Entende-se por ataque de pânico um período de tempo definido, no qual há o início súbito de um estado de apreensão intensa ou desconforto intenso, frequentemente associado com sentimento de catástrofe iminente. O TAG é definido pelo DSM-5 como um quadro clínico constituído por ansiedade e preocupação excessivas difíceis de serem controladas e que ocorrem por mais de seis meses, acompanhadas de sintomas físicos como cansaço excessivo, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e/ou distúrbios do sono (Associação Psiquiátrica Americana, 2013).

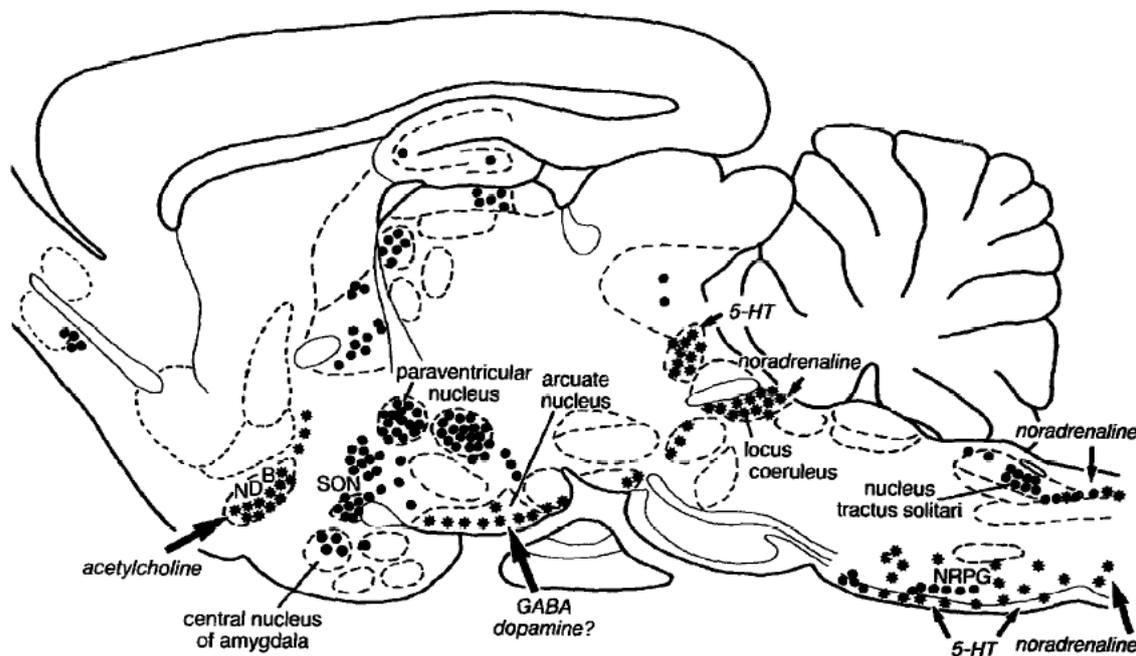
Em estudo recente sobre a saúde mental da população da cidade de São Paulo verificou-se que 29,6% da população estudada (n= 5037 indivíduos) apresenta

algum dos transtornos mentais descritos no DSM-4 (versão anterior ao DSM-5), sendo que desses, quase 50% relataram algum dos Transtornos de Ansiedade listados no mesmo manual. A “Pesquisa da Saúde Mental da Megalópole São Paulo” é o segmento brasileiro da “Pesquisa Mundial sobre a Saúde Mental” de iniciativa da Organização Mundial da Saúde (OMS). A prevalência de transtornos mentais na metrópole paulista foi a mais alta registrada em todas as áreas pesquisadas (ANDRADE *et al.*, 2012).

O tratamento farmacológico dos Transtornos de Ansiedade envolve primariamente a neurotransmissão monoaminérgica ou a GABAérgica. Entretanto, os fármacos disponíveis apresentam limitações consideráveis relacionadas à tolerabilidade e eficácia em parte dos pacientes. Dessa forma, os neuropeptídeos como a substância P, o neuropeptídeo Y e a galanina (GAL) surgem como possíveis novos alvos terapêuticos para os transtornos de ansiedade (para revisão HOLMES *et al.*, 2003b).

## 1.2 GALANINA

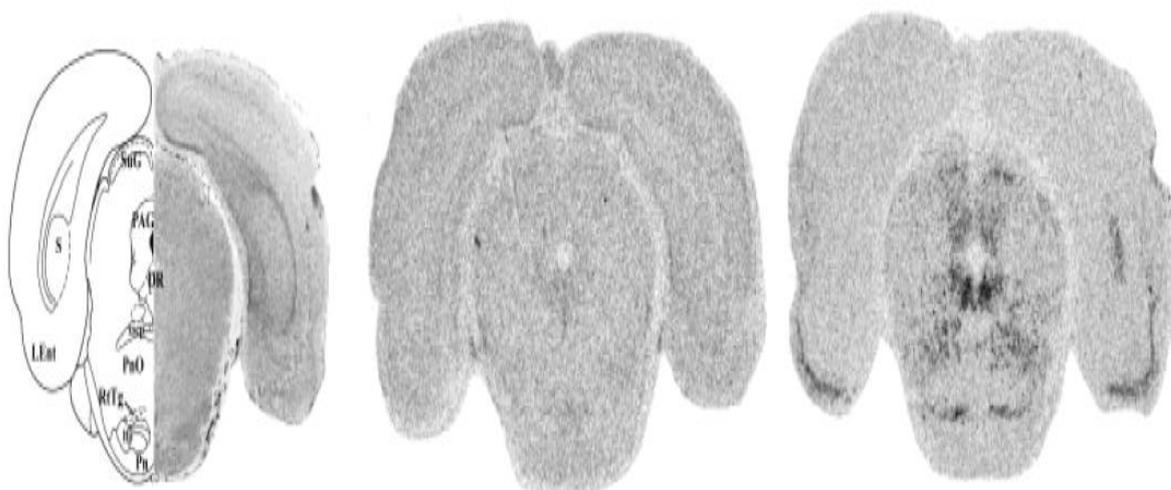
A GAL foi primeiramente isolada a partir do extrato de intestino de porco, sendo um peptídeo de 29 aminoácidos (30 em humanos) (TATEMOTO *et al.*, 1983). Está presente em abundância no sistema nervoso central (SNC) e periférico de inúmeros mamíferos, inclusive no do homem (GENTLEMAN *et al.*, 1989). No SNC de ratos, são observados neurônios imunorreativos para GAL no núcleo do leito da estria terminal (BNST), no tálamo, no septo medial, no hipocampo ventral, no estriado, no complexo amigdalóide, no hipotálamo, no núcleo dorsal da rafe (NDR), no locus coeruleus (LC) e no núcleo do trato solitário (MELANDER *et al.*, 1986a). A Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPD) recebe projeções galaninérgicas de outras estruturas, mas não sintetiza o peptídeo em seus corpos celulares (SMITH *et al.*, 1994; JACOBOWITZ *et al.*, 2004).



**Figura 1** - Distribuição dos principais grupos de células imunorreativas para GAL. Asteriscos indicam co-localização do neuropeptídeo com neurotransmissores clássicos. NDB, *nucleus of diagonal band*; NRPG, *nucleus reticular & paragiganto cellularis*; SON, *supraoptic nucleus*.

Fonte: Modificado de BARTFAL *et al.* (1992).

Foram clonados 3 diferentes subtipos de receptores para GAL, GALR1 e GALR3, acoplados a uma proteína G inibitória que diminui a ativação da adenilato-ciclase e abre canais de  $K^+$ , e GALR2, geralmente ligado a uma proteína  $G_q$  que aumenta a ativação da fosfolipase C, aumentando o  $Ca^{++}$  intracelular (KARELSON & LANGEL, 1998; BRANCHEK *et al.*, 2000). Através de estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ*, O'Donnell e colaboradores (1999) descreveram a distribuição do RNAm para os receptores galaninérgicos dos subtipos 1 e 2 no SNC de ratos. Esse estudo mostrou a presença expressiva de RNAm para GALR1 em áreas como o hipocampo, o hipotálamo, o NDR e LC, e de RNAm para GALR2 no hipotálamo, hipocampo, sendo que o NDR apresenta os mais altos níveis de expressão desse receptor. Os dois subtipos de receptores estão presentes em neurônios da MCP, embora o GalR1 tenha maior expressão (O'DONNELL *et al.*, 1999).



**Figura 2** - Auto-radiografia de filmes de hibridização *in situ* mostrando localização do RNAm para GALR1 (plano a direita) e GALR2 (plano central). Painel à esquerda é composto por um diagrama esquemático ilustrando as estruturas neuroanatômicas desse plano cerebral.

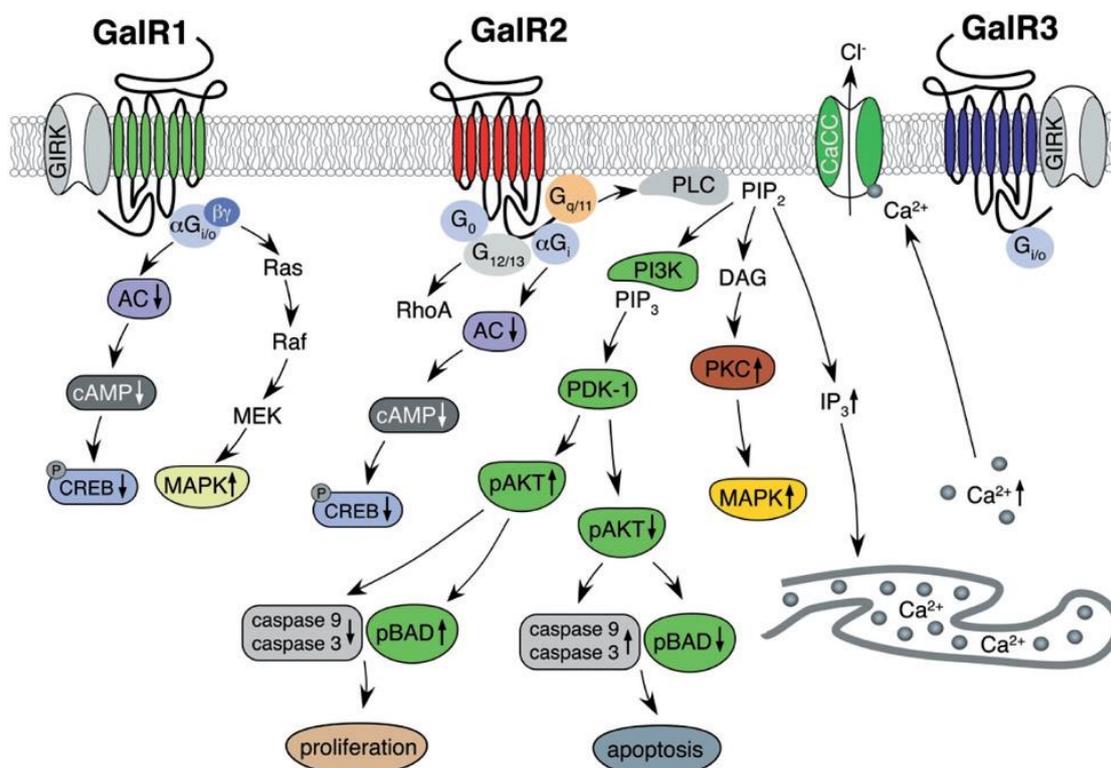
Fonte: Modificado de O'DONNELL *et al.* (1999).

A maioria dos ligantes para os receptores de GAL disponíveis são peptídeos quiméricos (BARTFAI *et al.*, 1992) ou análogos sintéticos desses, como o galanin(1-13)-Pro-Pro-(Ala-Leu)<sup>2</sup>-Ala amide (LEIBOWITZ & KIM, 1992). O fato de em geral não serem seletivos para um subtipo de receptor, e sua ação farmacológica depender do tecido alvo limitam seu uso (BARTFAI *et al.*, 1991; BEDECS *et al.*, 1995; LU *et al.*, 2005a). Recentemente foram desenvolvidos compostos peptídicos e não peptídicos com relativa seletividade para os subtipos de receptores galaninérgicos (LUNDSTROM *et al.*, 2005a; BARR *et al.*, 2006; SOLLENBERG *et al.*, 2006). O M617 (galanin-(1-13)-Gln<sup>14</sup>-bradykinin-(2-9)-amide) é um peptídeo quimérico da GAL que possui seletividade para GALR1 até 25 vezes maior do que para GALR2, sendo classificado como um ligante seletivo para receptores do tipo GALR1 (LUNDSTROM *et al.*, 2005b). Já o AR-M1896, um fragmento da GAL (2-11), inicialmente foi classificado como agonista seletivo para GALR2 (LIU *et al.*, 2001), porém, hoje se sabe que o AR-M1896 liga-se com a mesma afinidade a receptores do tipo GALR2 e GALR3 de ratos, sendo então classificado como um ligante “não-GALR1” (LU *et al.*, 2005b). Do ponto de vista farmacológico, também é de grande interesse o uso de antagonistas seletivos para entendimento da contribuição de

cada receptor no recrutamento fisiológico da neurotransmissão galaninérgica. Entretanto, estão disponíveis atualmente antagonistas seletivos para receptores do tipo GALR2 (M871; SOLLENBERG *et al.*, 2006) e GALR3 (SNAP 37889; SNAP 398299; SWANSON *et al.*, 2005; KONKEL *et al.*, 2006). Ainda não há antagonistas com alta afinidade para GALR1, o que limita os estudos com a GAL na MCPD, já que a população de receptores galaninérgicos dessa região é em sua maioria do subtipo 1 (O'DONNELL *et al.*, 1999).

De uma maneira geral, a GAL parece ter efeito inibitório no SNC causando uma hiperpolarização dos neurônios em consequência à abertura de canais de potássio. Apresentando co-localização neuronal com diversos neurotransmissores (MELANDER *et al.*, 1986b), esse peptídeo exerce, em geral, um efeito inibitório sobre a liberação destes. Por exemplo, inibe a liberação de glutamato (GLU) no hipocampo (ZINI *et al.*, 1993), de noradrenalina no LC (PIERIBONE *et al.*, 1998) e a de serotonina no NDR (XU *et al.*, 1998).

A GAL tem sido implicada na modulação de diversos processos fisiológicos, tais como a nocicepção, a busca por alimentos e sexual, aprendizado e memória (WANG *et al.*, 1999; PARK & BAUM, 1999; WRENN & CRAWLEY, 2001; BREWER *et al.*, 2005). Esse neuropeptídeo parece estar relacionado também com a gênese de patologias como o Alzheimer e alguns tipos de câncer (MUFSON *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007; BERGER *et al.*, 2005).



**Figura 3** - Diferentes vias de sinalização para os três subtipos de receptores descritos para GAL. Fonte: Hökfelt & Tatemoto (2008).

A distribuição da GAL e de seus receptores em estruturas envolvidas com o controle das emoções, assim como seu efeito anticonvulsivante semelhante àquele de outros ansiolíticos (MAZARATI *et al.*, 2006) apontam para um possível papel modulatório desse neuropeptídeo sobre a ansiedade (WRENN & CRAWLEY, 2001). Estudos pré-clínicos têm mostrado a participação da GAL na ansiedade. Por exemplo, camundongos knockout para o receptor GALR1 (HOLMES *et al.*, 2003a) ou para o receptor GALR2 (BAILEY *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2008) apresentaram um perfil ansiogênico quando expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Em camundongos knockout para GALR3 tal perfil comportamental se repetiu em diferentes modelos de ansiedade (BRUNNER *et al.*, 2014). Por outro lado, camundongos transgênicos que superexpressam o peptídeo não exibem fenótipo ansiolítico quando testados em modelos de ansiedade sob condições basais não desafiadoras (HOLMES *et al.*, 2002). Porém, esses camundongos são não responsivos aos efeitos ansiogênicos da ioimbina, um antagonista  $\alpha$ -2-adrenérgico, sugerindo que a GAL contribui para a

modulação de estados de ansiedade induzidos por altos níveis de ativação noradrenérgica (HOLMES *et al.*, 2002).

A modulação galaninérgica em situações de estresse também tem sido relatada. Por exemplo, a GAL foi capaz de prevenir a diminuição da atividade locomotora e exploração do Campo Aberto (CA) causada pelo estresse de restrição em ratos (KLENEROVA *et al.*, 2011). Já um agonista não seletivo de receptores galaninérgicos, o Galnon, foi capaz de reduzir respostas relacionadas ao estresse em um modelo que se assemelha ao que ocorre no Transtorno de Estresse Pós-traumático, permitindo que o animal explorasse mais os braços abertos (BAs) do LCE (KOZLOVSKY *et al.*, 2009). O Galnon, quando administrado por via intraperitoneal (i.p.), também induziu efeito ansiolítico em diferentes modelos experimentais de ansiedade, como Labirinto em “Zero” Elevado e a hipertermia induzida pelo estresse (RAJARAO *et al.*, 2007). E por fim, antagonistas seletivos para os receptores GALR3 mostraram efeito ansiolítico e antidepressivo, aumentando a interação social e reduzindo o tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF) em ratos (SWANSON *et al.*, 2005).

Estudos clínicos também fortalecem a hipótese de que o sistema galaninérgico participe da modulação de estados de ansiedade e depressão (JUHASZ *et al.*, 2014), sendo que recentemente foi descrita uma possível relação entre a severidade dos sintomas do TP em mulheres e variações no gene da GAL, implicando numa ação estrógeno-dependente da GAL na fisiopatologia da ansiedade e da depressão (UNSCHULD *et al.*, 2008; 2010).

Em relação às estruturas envolvidas nessa modulação, os resultados são contraditórios, sugerindo que o efeito da GAL dependa do sítio de administração e do modelo de ansiedade utilizado (ECHEVARRIA *et al.*, 2005; BARRERA *et al.*, 2006). A administração intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) de GAL em ratos induziu efeito ansiolítico no teste de Vogel modificado (BING *et al.*, 1993). Já a administração de GAL na amígdala central (ACe) induziu efeito ansiogênico em ratos testados no teste de Vogel modificado, mas não no LCE (MOLLER *et al.*, 1999). Por outro lado, a administração de GAL intra-ACe preveniu as consequências comportamentais do estresse de restrição (aguda) em ratos submetidos ao LCE.

Esse efeito foi bloqueado pela administração prévia do antagonista não seletivo M40 (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002b). O mesmo antagonista, administrado no BNST lateral, atenuou as consequências comportamentais do estresse de restrição (aguda) no teste de interação social e no LCE (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002a). Ainda para o M40, quando administrado bilateralmente no Septo Lateral (SL), inibiu em ratos o comportamento ativo de esconder uma sonda eletrificada, que acontece em resposta ao estresse de restrição (aguda), e representa um efeito tipo-ansiolítico (ECHEVARRIA *et al.*, 2005). Ainda, a ativação de receptores GALR2 aumentou o efeito ansiolítico mediado pelos receptores para neuropeptídeo Y do tipo 1 (NPYYR1), pela formação de um heterorreceptor GALR2/NPYYR1 na amígdala (NARVÁEZ *et al.*, 2014).

Dados recentes de nosso grupo mostraram a relação entre a GAL e ansiedade no mesencéfalo, já que a administração desse neuropeptídeo, intra-NDR médio-caudal, na dose de 0,3nmol/0,2µL induziu efeito ansiolítico na esQUIVA INIBITÓRIA DO LABIRINTO em T elevado (LTE), sem alteração da atividade locomotora (SILOTE *et al.*, 2013). Entretanto, o papel da GAL na ansiedade mediada pela MCP permanece por ser investigado.

### **1.3 MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (MCP)**

A MCP está localizada no mesencéfalo, e juntamente com estruturas como o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipocampo compõe o chamado Sistema Límbico, que é o conjunto de estruturas encefálicas responsáveis pela expressão das diversas emoções (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012). A MCPD é considerada uma estrutura-chave para a expressão comportamental e autonômica defensiva, fazendo parte, junto com o hipotálamo e a amígdala, do chamado Sistema Cerebral de Defesa, constituído de regiões que ao serem estimuladas elétrica e quimicamente fazem com que o animal exiba comportamentos semelhantes aos que ocorrem diante do

predador (GRAEFF, 1990). Mais tarde, em complementação a essa teoria, foi concebida a ideia do Sistema Comportamental de Aproximação (SCA), que seria encarregado de dirigir o animal para situações prazerosas, como alimentação e sexo. Tal concepção permitiu o entendimento da ansiedade como um produto da ação simultânea dos dois sistemas, onde o animal viveria o clássico conflito aproximação-esquiva (GRAY & MCNAUGHTON, 2000).

Respostas aversivas distintas são geradas por diferentes agentes estressores, sendo que as “estratégias de defesa ativa” envolvem o confronto, a luta e a fuga; e as “estratégias de defesa passiva” são aquelas onde a responsividade do indivíduo ao ambiente se encontra diminuída, levando à imobilidade e/ou quiescência. Sabe-se que a MCP é organizada longitudinalmente em substratos colunares com diferentes propriedades em termos anatômicos e funcionais (CARRIVE, 1993; BANDLER & SHIPLEY, 1994; KRIEGER & GRAEFF, 1985; BITTENCOURT *et al.*, 2004). As “estratégias de defesa ativa”, que se assemelham muito às desencadeadas por um gato ou rato ameaçado, ocorrem em decorrência da estimulação das colunas dorsolateral (dl) e lateral (l) da MCP. A estimulação dessas colunas provoca ainda, aumento da pressão arterial e taquicardia. Uma análise do perfil de perfusão vascular de animais que tiveram essas colunas estimuladas, mas que não desempenharam atividade motora prévia, sugere que essas alterações cardiovasculares não são secundárias à atividade somato-motora, sendo resultado de resposta central (KEAY & BANDLER, 2001). Para a coluna ventrolateral (vl) da MCP, a estimulação desencadeia “estratégias de defesa passiva”, caracterizadas pelo “desligamento” do ambiente, com responsividade diminuída, hipotensão e bradicardia. Esse comportamento de defender-se de forma não ativa é geralmente uma resposta a agentes estressores de natureza “inescapável”, concretos ou mesmo psicológicos. Além disso, a estimulação da MCPvl provoca analgesia de origem opioide, a qual é relativamente duradoura (KEAY & BANDLER, 2001).

Em condições fisiológicas, as respostas de defesa ativa evocadas pela MCP são provavelmente mediadas pela liberação de GLU local (GUIMARÃES *et al.*, 2005). Evidências experimentais indicam que ácido gama-amino-butírico (GABA) inibe de forma tônica os comportamentos defensivos na amígdala, no hipotálamo e na MCP

(BEHBEHANI, 1995). Ainda, a acetilcolina parece facilitar os comportamentos defensivos na MCP e no hipotálamo (GRAEFF, 1994). Outros neurotransmissores atípicos também têm sido implicados na modulação de comportamentos tipo-ansiedade na MCPdl, como o Óxido Nítrico (NO), os endocanabinoides e até mesmo os vaniloides (para revisão FOGAÇA *et al.*, 2012).

A MCPD é o principal sítio de processamento do medo e da ansiedade (BEHBEHANI, 1995). Dessa forma, muitos estudos pré-clínicos em modelos animais para screening de drogas com ação na ansiedade sugerem a participação dessa estrutura em patologias como o TAG e TP. O antagonista de receptores NMDA ácido DL-2-amino-7-fosfoetanóico (AP7) foi capaz de aumentar o número de lambidas punidas no Teste de Conflito de Vogel (TCV), quando injetado na MCPdl (MOLCHANOV *et al.*, 2002). Ainda, o efeito ansiogênico da administração de NMDA intra-MCPD, avaliado no LCE, foi bloqueado pela prévia administração de um antagonista para receptores serotoninérgicos do tipo 5HT<sub>1A</sub> (MORAES *et al.*, 2008). Já a estimulação química (com injeção de antagonista GABA<sub>A</sub>) ou elétrica da MCPD, 30 minutos antes da exposição ao LTE, levou a um efeito tipo-ansiolítico em ratos avaliados na esQUIVA inibitória (CAMPLESI JR. *et al.*, 2012). E o endocanabinoide e endovaniloide anandamida (AEA) exerceu efeito ansiolítico, através da ativação do receptor endocanabinoide CB1, quando administrado intra-MCPdl de ratos testados nos testes do LCE e Vogel (FOGAÇA *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao TP, estudos têm sido realizados com a administração de substâncias na MCPD e posterior avaliação em modelos animais para screening de drogas que atuam no pânico. Schenberg e colaboradores (2002) verificaram que o tratamento crônico com a fluoxetina ou com a clomipramina, inibidores da recaptação de serotonina, foi capaz de aumentar o limiar para exibição de comportamentos incondicionados evocados pela estimulação elétrica da MCPD, o que é interpretado como uma ação tipo-panicolítica dessas drogas (SCHENBERG *et al.*, 2002). Além disso, através de um protocolo de estimulação elétrica com administração na MCPD de agonistas e antagonistas para receptores canabinoides (CB1) e vaniloides (TRPV1), verificou-se que esses receptores modulam a ansiedade inibindo e facilitando, respectivamente, a ocorrência de respostas

defensivas vistas nesse modelo (CASAROTO *et al.*, 2012). No mesmo sentido, estudos clínicos de neuroimagem em populações com condições clínicas ou saudáveis confirmam a literatura em torno de estudos pré-clínicos que implicam a MCP como uma região envolvida na regulação de funções como a dor, a ansiedade e reações autonômicas (para revisão LINNMAN *et al.*, 2012).

#### **1.4 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE**

Os modelos animais de ansiedade são importantes ferramentas para estudo da neurobiologia dos transtornos de ansiedade, assim como para a avaliação de potenciais novos alvos moleculares para o tratamento desses transtornos (CRYAN & SWEENEY, 2011). Robert e Caroline Blanchard, avaliando as respostas comportamentais defensivas de ratos selvagens em confronto com predadores, classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça, se potencial ou real (se real, distal ou proximal). No nível de ameaça potencial, o animal depara-se com a novidade, que contém tanto possíveis fontes de satisfação de necessidades biológicas como possíveis perigos (ou uma ameaça já foi encontrada no passado). As estratégias observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados comportamentos de avaliação de risco. Já no nível de ameaça real, foi observada imobilidade ou “congelamento”, e no caso em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal, os comportamentos observados foram fuga ou luta defensiva (BLANCHARD *et al.*, 1986).

Os comportamentos defensivos são reações do organismo a perigos presentes ou potenciais, e são específicos para cada situação de perigo com amplitudes que podem variar de uma resposta de pânico em animais frente ao ataque de um predador até respostas mais sutis, como esquiva frente a perigos potenciais

(NESSE, 1999). Os modelos animais de medo/ansiedade favoreceriam a expressão do comportamento de defesa frente a situações artificiais ou naturais de perigo (CAROBREZ, 2003).

Com base na observação do comportamento animal diante das diferentes situações de ameaça, e a aproximação desses comportamentos aos que ocorrem em seres humanos, modelos animais de ansiedade têm sido desenvolvidos para testar substâncias com potencial terapêutico.

Atualmente, muitos são os testes disponíveis para avaliação da ansiedade em animais, sendo que em uma das classificações aceitas, os principais modelos utilizados podem ser divididos em duas classes: Testes de Conflito Incondicionado (como o LCE, LTE, teste de interação social, e outros), onde o comportamento de esquiva é consequência de condições presentes no ambiente de teste que são naturalmente aversivas para o animal, como a claridade, o odor do predador, a novidade; e Testes de Conflito Condicionado, onde condições aversivas são introduzidas ao ambiente de teste e o animal então, exibe um comportamento de aversão diante de tal situação, como a punição (CRYAN & SWEENEY, 2011; CAMPOS *et al.*, 2013). Entre os testes de conflito condicionado, destaca-se o TCV.

Dessa forma, diferentes modelos animais de ansiedade foram empregados no desenvolvimento do presente trabalho, sendo eles: LCE, LTE e o TCV.

#### **1.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O modelo do LCE baseia-se no comportamento exploratório espontâneo de roedores em um ambiente com características aversivas de maior (braços abertos - BAs) e menor (braços fechados - BFs) intensidade. Esse fato gera um conflito aproximação-esquiva aos BAs. Em estudo de investigação sistemática do LCE, verificou-se que dentre os diversos estímulos aversivos aos quais o modelo expõe o

animal, como o ambiente novo, a altura do labirinto percebida nos BAs e o ambiente aberto em torno do aparelho, a falta de proteção no ambiente em torno dos BAs destaca-se como o principal fator gerador de ansiedade para o animal nesse modelo (PELLOW *et al.*, 1985; TREIT *et al.*, 1993).

O aparelho para esse teste consiste de um labirinto formado por dois BFs, circundados por paredes de 40 cm de altura, e dois braços abertos (BAs), unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Em validação comportamental e farmacológica desse modelo, realizado por Pellow e colaboradores (1985), verificou-se que os ratos apresentam naturalmente, de maneira significativa, um menor número de entradas nos BAs em relação aos BFs, e também despendem um menor tempo nos BAs. Contudo, a administração de substâncias com efeito ansiolítico na prática clínica como o clordiazepóxido, o diazepam e menos efetivamente o fenobarbital, levou a um aumento na porcentagem de tempo despendido e no número de entradas nos BAs do LCE. A ioimbina, um antagonista seletivo  $\alpha_2$ , de propriedades ansiogênicas, reduziu a exploração dos BAs. O antidepressivo imipramina, que apresenta como importante efeito colateral na clínica a sedação, mas não efeito ansiolítico, reduziu a exploração do LCE de um modo geral (PELLOW *et al.*, 1985).

Em análise fatorial da exploração geral do LCE verificou-se que as variáveis número de entradas nos BAs, tempo de permanência nos BAs, e a razão entre o número de entradas nos BAs em relação ao total relacionaram-se positivamente no fator que discrimina medida de ansiedade. Ainda nesse estudo, o número de entradas nos BFs se relacionou positivamente, sobrepondo-se ao número total de entradas, com o fator que discrimina a atividade locomotora (CRUZ *et al.*, 1994).

O LCE é o modelo animal para *screening* de drogas ansiolíticas mais utilizado no mundo (HALLER & ALICKI, 2012) e os resultados provenientes da sua aplicação têm contribuído para o desenvolvimento de novos compostos ansiolíticos e também para o conhecimento das bases neurobiológicas da ansiedade (CAROBREZ, 2003).

### 1.4.2 Labirinto em T Elevado (LTE)

A partir do LCE, Graeff e colaboradores (1993) desenvolveram um modelo animal de ansiedade para separar, no mesmo animal, o medo condicionado do medo incondicionado. Os ratos possuem um medo inato de lugares abertos, parecendo ser uma situação aversiva para o animal, o que faz com que ele aprenda a esquivar-se se colocado repetidamente na extremidade interna do BF. Por outro lado, quando o rato é colocado na extremidade de um dos BAs ele pode se dirigir para o BF, o que corresponde a uma resposta de fuga, sendo esses dois comportamentos os parâmetros avaliados nesse modelo de ansiedade experimental (ZANGROSSI & GRAEFF, 1997).

Em estudo de validação com drogas ansiolíticas, ambos o agonista benzodiazepínico diazepam e o agonista serotoninérgico ipsapirona comprometeram a esquivar-se inibitória de uma forma dose-dependente (GRAEFF *et al.*, 1998). Sendo assim, a esquivar-se inibitória no LTE pode ser relacionada com condições patológicas responsivas a agonistas serotoninérgicos ou baixas doses de benzodiazepínicos, tal como ocorre clinicamente para o TAG. Em contraste, a fuga não é alterada por essas drogas, o que pode ser relacionado com a ineficácia desses medicamentos no tratamento do TP (NUTT, 1991). Além disso, a latência de fuga aumenta em animais tratados cronicamente com antidepressivos como a fluoxetina, clinicamente eficaz no TP, sugerindo a relação do comportamento apresentado com esse transtorno de ansiedade (POLTRONIERI *et al.*, 2003).

### 1.4.3 Teste de Conflito de Vogel (TCV)

O TCV baseia-se em um conflito condicionado operante, o qual envolve um reforço negativo (choque) que inibe o comportamento de busca por água exibido pelo animal. Neste teste, os animais são submetidos previamente à restrição hídrica por

um período de 48h. O aparelho de execução consiste de uma caixa que possui em seu interior assoalho com grade de aço e um bebedouro com bico também de aço, dessa forma, quando o animal faz contato simultâneo com estes dois componentes metálicos fecha-se o circuito elétrico existente e um choque é liberado em suas patas. Sendo assim, o conflito presente é o da necessidade de água mas não buscá-la devido à punição recebida pelo animal (VOGEL *et al.*, 1971).

Ansiolíticos de uso bem estabelecido na clínica como os benzodiazepínicos e os barbitúricos induzem aumento do número de lambidas punidas, o que indica um bom valor preditivo desse teste. Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos, com inibidores da monoamino-oxidase e com o agonista parcial de receptores do tipo 5HT<sub>1A</sub>, buspirona, também causam o aumento de respostas punidas, não ocorrendo o mesmo para os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs) (SCHEFKE *et al.*, 1989; FONTANA & COMMISSARIS, 1988).

Uma limitação desse protocolo deve-se ao fato de drogas que interferem no mecanismo da sede e drogas anti-nociceptivas terem também a capacidade de aumentar o número de lambidas punidas sem, no entanto, modular a ansiedade. Tal fato torna necessária a realização de testes controle, tais como o teste de “avaliação do consumo de água”, que utiliza o mesmo aparelho do TCV sem a liberação de choques, e o “teste de retirada da cauda” que avalia a capacidade nociceptiva do animal através de estímulo térmico na cauda (MOREIRA *et al.*, 2006).

## **1.5HIPÓTESE**

A MCPD é considerada uma estrutura-chave para a expressão comportamental e autonômica do comportamento defensivo, fazendo parte, junto com o hipotálamo e a amígdala, do chamado Sistema Cerebral de Defesa (GRAEFF, 1990). Entretanto, a participação da GAL na modulação do comportamento defensivo por essa estrutura ainda não foi estudada. Essa estrutura mesencefálica recebe projeções

galaninérgicas de outras estruturas, mas não sintetiza o peptídeo em seus corpos celulares (SMITH *et al.*, 1994; JACOBOWITZ *et al.*, 2004). Estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* descreveram a presença dos receptores GALR1 e GALR2 em neurônios da MCP de ratos, embora o GALR1 apresente maior densidade na marcação (O'DONNELL *et al.*, 1999).

A hipótese verificada com a realização do presente trabalho foi se a GAL exógena, quando administrada intra-MCPD, poderia modular a ansiedade experimental em ratos submetidos a diferentes modelos experimentais de ansiedade, como o LCE, o LTE e o TCV. Considerando, dessa forma, que os GALR1 inibitórios se apresentam em maior número na MCP, que a GAL parece reduzir a liberação de glutamato (KINNEY *et al.*, 1998), e considerando que a diminuição da atividade dos neurônios glutamatérgicos excitatórios através do antagonismo de receptores NMDA ou não-NMDA para GLU nessa estrutura produz efeito ansiolítico no LCE (GUIMARÃES *et al.*, 1991; MATHEUS E GUIMARÃES, 1997), este estudo também testou a hipótese de que o possível efeito ansiolítico da GAL fosse mediado por receptores GALR1, através da utilização de ligante seletivo para este receptor.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Investigar o envolvimento da GAL sobre a modulação da ansiedade experimental mediada pela MCPD de ratos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Testar a hipótese de que a injeção de GAL intra-MCPD induziria efeito ansiolítico em diferentes modelos animais de ansiedade: LCE, LTE e Vogel.
- Testar a hipótese de que a injeção intra-MCPD de M617 (agonista GALR1), mas não de AR-M1896 (agonista GALR2/GALR3) induziria efeito ansiolítico no LCE.
- Testar a hipótese de que a injeção de GAL intra-MCPD induziria efeito panicolítico na tarefa de fuga no LTE.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos (220-250 g), provenientes do Biotério Central da UFES, mantidos em grupos de 4 a 5 animais por gaiola, à temperatura de  $24 \pm 2$  °C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas e tendo livre acesso à água e comida. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa universidade (CEUA-UFES) sob número 108/11.

#### 3.2 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas, diluídas em água para injeção:

- Galanina aminoácidos 1-29 (GAL; Tocris Bioscience, EUA) nas doses de 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/0,2 µL (doses com base em estudos preliminares em nosso laboratório);
- Galanin-(1–13)-Gln14-bradykinin-(2–9)-amide (M617; Tocris Bioscience, EUA), agonista seletivo dos receptores GALR1, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/0,2 µL (doses com base nos estudos de KUTEEVA *et al.*, 2008);
- Galanin-(2–11)-amide (AR-M1896; Tocris Bioscience, EUA), agonista seletivo dos receptores GALR2, nas doses de 0,3; 1,0; 3,0 nmoles/0,2 µL (doses com base nos estudos de KUTEEVA *et al.*, 2008).

### 3.3 IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA

Os animais foram submetidos, após anestesia com tribromoetanol (250mg/Kg i.p., Sigma-Aldrich, Alemanha), à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia de 11,5 mm de comprimento diretamente na MCPD (Coordenadas a partir do Atlas de Paxinos e Watson, 2009: AP-lambda: 0 mm; L: 2,0 mm; e P: 4,0 mm, ângulo de 15°). Antes da incisão, o animal recebeu injeção infiltrativa de lidocaína (SS WHITE, S.S.WHITE 100®) a 2% com vasoconstritor. A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico auto-polimerizante (JET®). O mandril, que é removido no momento da injeção, foi colocado no interior da cânula-guia com o objetivo de evitar problemas como obstrução e para reduzir contaminação. Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de 0,2 mL de antibiótico (FORT DODGE, Pentabiótico® Veterinário Pequeno Porte), para prevenir infecções, e injeção subcutânea de flunixinina meglumina (Intervet, Banamine®) um anti-inflamatório, para redução do desconforto. Os experimentos foram iniciados 5 a 7 dias após a recuperação dos animais.

### 3.4 INJEÇÃO E HISTOLOGIA

O procedimento de injeção consistiu da remoção do mandril e introdução de uma agulha odontológica gengival de 12,50 mm de comprimento no interior da cânula-guia, até atingir a MCPD 1,00 mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha foi conectada a uma micro-seringa de 10 µL (Hamilton, EUA) através de um segmento de Polietileno (P10). A infusão foi realizada com auxílio de uma Bomba de Infusão (Insight Instrumentos - Riberão Preto, SP, Brasil), na velocidade de 0,2 µL/min para todas as drogas.

Após os experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com uretana 25% (5mL/Kg i.p., Sigma-Aldrich, Alemanha), e através da mesma cânula pela qual foi administrada a droga, foi injetado o corante Azul de Evans a 1%. Logo em seguida os animais foram perfundidos intracardiacamente com salina e formol a 10%, e seus encéfalos removidos e armazenados na solução de formol por no mínimo 3 dias. Após esse período procedeu-se o corte dos encéfalos, no Laboratório de Histologia Molecular e Imunoistoquímica do CCS/UFES (LHMI-UFES), com o auxílio de um criostato (CM1850, Leica, Alemanha), em seções coronais de 50µm. Esses cortes foram analisados ao microscópio, localizando os sítios de injeção de acordo com os diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2009).

### **3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS**

#### **3.5.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O LCE é um labirinto de madeira, formado por dois braços fechados (BFs), circundados por paredes de 40 cm de altura, e dois braços abertos (BAs), unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Durante o teste, com duração de 5 minutos, o comportamento dos animais foi registrado por uma câmera de vídeo. Posteriormente, foram quantificados o número de entradas e o tempo de permanência nos BAs e BFs. O modelo foi validado comportamental e farmacologicamente, observando-se sua utilidade para detectar efeitos ansiolítico e ansiogênico através da análise de índices obtidos com o comportamento exploratório dos animais (PELOW *et al.*, 1985).



**Figura 4** - Foto ilustrativa do aparelho utilizado para os testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

### **3.5.2 Labirinto em T Elevado (LTE)**

Este modelo derivou-se do LCE sendo desenvolvido por Graeff e colaboradores (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; ZANGROSSI & GRAEFF, 1997) para avaliar em um mesmo procedimento, dois tipos de ansiedade: medo condicionado/aprendido e medo incondicionado/inato. O LTE é constituído de três braços de iguais dimensões (50x10 cm), sendo um deles cercado por paredes de 40 cm de altura, o Braço Fechado, perpendicular a outros dois cercados apenas por uma aresta de 1,0 cm, sendo estes chamados de Braços Abertos.

No quarto e quinto dia após o procedimento cirúrgico, cada animal foi manuseado pelo experimentador por 5 minutos. No sexto dia após o procedimento cirúrgico, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do LTE, onde permaneceu por 30 minutos. O braço aberto foi isolado do braço fechado, bem como do outro braço aberto, por uma parede de madeira (50 cm de comprimento por 12 cm de largura). Teixeira e colaboradores (2000) demonstraram que a exposição prévia dos animais a um dos braços abertos do LTE reduz a latência de saída do BA, sugerindo que a pré-exposição diminui o caráter exploratório, o que faz com que os animais fujam do perigo e não apenas caminhem em direção ao BF (TEIXEIRA *et al.*, 2000). No sétimo dia após a cirurgia procedeu-se o teste, e os parâmetros avaliados estão descritos a seguir.

*Esquiva inibitória:* os animais foram colocados na extremidade interna do BF e realizou-se 3 tentativas sucessivas (esquiva basal, esquiva inibitória 1 e esquiva inibitória 2), com intervalo de 30 segundos entre cada uma, nas quais se mediu o tempo para os animais deixarem o BF (medida de acordo com GRAEFF *et al.*, 1993).

*Fuga:* 30 segundos após a medida da esquiva inibitória 2, os animais foram colocados na extremidade do mesmo BA onde foi realizada a pré-exposição, e realizou-se então três tentativas sucessivas, com intervalo de 30 segundos entre cada uma, nas quais se mediu que os animais levaram para sair do BA (Fuga 1, 2 e 3).

Foi estipulado um tempo de permanência máxima no labirinto em cada tentativa, tanto na esquiva inibitória quanto na fuga, que correspondeu a 300 s. Trinta segundos após a finalização do teste no LTE os animais foram colocados em um campo aberto para avaliação da atividade locomotora por 5 minutos.

A partir de uma análise fatorial investigou-se a relação entre as variáveis obtidas no teste do LTE, juntamente com os dados de atividade locomotora avaliados no CA. Verificou-se que as variáveis Esquiva 1 e 2 emergiram em um mesmo fator, sendo interpretadas como medidas de ansiedade aprendida, e que as variáveis Fuga 2 e 3 emergiram em um fator diferente, sendo interpretadas como medidas para avaliação

de ansiedade inata. Esse estudo complementa os resultados dos estudos de validação com ansiolíticos, onde as duas tarefas avaliadas nesse teste têm sensibilidade diferente às drogas testadas, e ainda suporta a ideia do LTE ser capaz de gerar no mesmo animal dois tipos diferentes de reações de defesa que estão relacionadas com facetas diferentes da ansiedade (TORREJAIS *et al.*, 2008).

### **3.5.3CAMPO ABERTO (CA)**

O aparelho utilizado neste teste consiste em uma caixa quadrada de madeira com piso preto de 1 m<sup>2</sup> de área, sendo delimitado por 4 paredes de 30 cm de altura que impedem a fuga do animal. O teste no CA foi executado 30 segundos após o término da realização do LTE com o mesmo animal.

No teste os animais são posicionados na região central do aparelho e, durante 5 minutos, podem explorá-lo livremente (SILOTE *et al.*, 2013). O teste foi gravado por meio de uma webcam conectada a um microcomputador. O comportamento dos animais foi analisado utilizando-se do software ANY-maze™ versão 4.98 para Windows (Stoelting Company, Wood Dale, IL, EUA). O parâmetro comportamental observado foi a distância total percorrida (cm). Este teste é utilizado principalmente para mensurar o comportamento locomotor e exploratório em animais experimentais, embora também evidencie possível nível de ansiedade nestes. Animais com níveis elevados de ansiedade tendem a ter baixa atividade motora e grande preferência pela periferia do campo aberto (BELZUNG & PRUT, 2003).



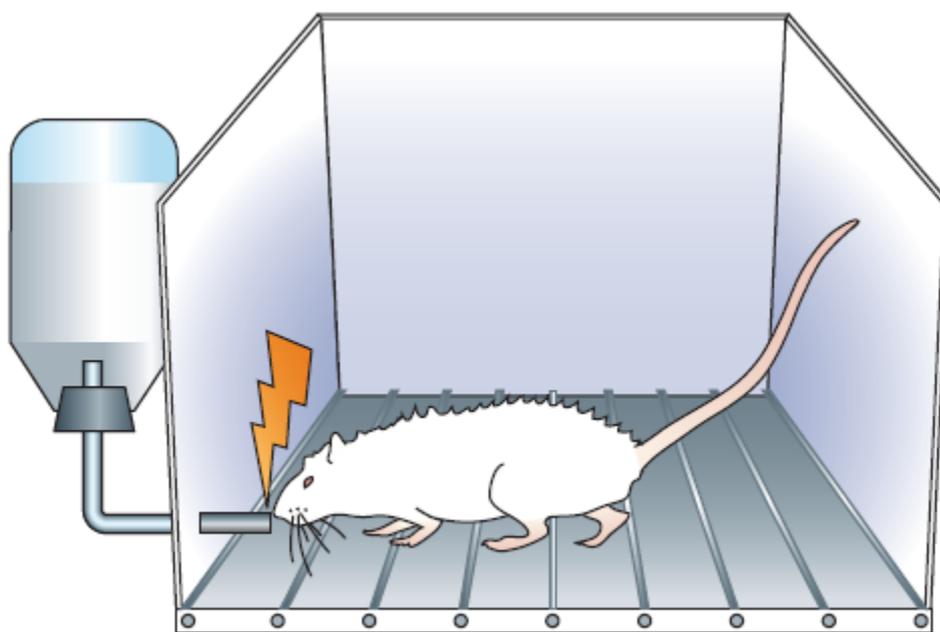
**Figura 5** - Foto ilustrativa do aparelho utilizado para os testes do Campo Aberto (CA).

#### **3.5.4 Teste de Conflito de Vogel (TCV)**

O TCV é realizado em uma caixa (Insight, modelo EP 103V - Caixa de Lambidas) que possui assoalho de aço inoxidável, e projetado para seu interior há o cano metálico de um bebedouro para ratos contendo água. No momento do teste, o contato simultâneo do animal com a grade de aço e o cano metálico do bebedouro fecha um circuito elétrico, controlado por um sensor, que libera choques de 0,5 mA/s a cada 20 lambidas do animal no bebedouro. Ao final do teste é averiguado o número total de lambidas realizadas por cada animal registradas pelo sensor.

Para realização do TCV os animais sofrem um período de restrição de água que se inicia 48h antes da realização do teste propriamente dito. Porém, 24h antes do teste,

os animais passam pelo procedimento de pré-exposição ao aparelho, que tem como objetivo reduzir o tempo que o animal leva para encontrar o bebedouro no dia do teste. Na pré-exposição o animal é colocado na caixa, podendo explorá-la livremente; A partir do momento que o rato encontra o bebedouro, são contabilizados 3 minutos, durante os quais o mesmo pode consumir água sem receber choques. Após o término do procedimento, os animais são colocados novamente em suas caixas e permanecem em restrição de água até o momento do teste. O teste, assim como a pré-exposição, tem duração de 3 minutos, considerado a partir do momento que o animal encontra o bebedouro (JARDIM *et al.*, 2005).



**Figura 6** - Desenho esquemático do aparelho utilizado para o Teste de Conflito de Vogel (TCV).

Fonte: GRIEBEL & HOLMES, 2013.

## **3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS**

### **3.6.1 EXPERIMENTO 1 - Efeito da GAL intra-MCPD, nas doses de 0,1, 0,3 e 1,0 nmol/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LCE**

Para condução do experimento os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle, que recebeu salina (n=11); e 3 grupos que receberam GAL em diferentes doses, GAL 0,1 nmol/0,2  $\mu$ L (n=7), GAL 0,3 nmol/0,2  $\mu$ L (n=12) e GAL 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=9) intra-MCPD. Decorridos 20 minutos após a injeção da GAL ou salina, os animais foram submetidos ao LCE por 5 min para avaliação do comportamento.

### **3.6.2 EXPERIMENTO 2 - Efeito do M617 e do AR-M1896 intra-MCPD, nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0 nmoles/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LCE**

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle, que recebeu salina (n=8); e mais 3 grupos que receberam o agonista seletivo para GALR1 intra-MCPD em doses diferentes, M617 0,3 nmol/0,2  $\mu$ L (n=9), M617 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=9) e M617 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L (n=8). Os animais foram submetidos ao LCE 20 min após a injeção do M617 ou salina.

Ainda nesta fase foi verificado o efeito do AR-M1896, injetado na MCPD de ratos submetidos ao LCE. Foram 4 grupos: grupo controle, que recebeu salina (n=12), e outros 3 que receberam diferentes doses do agonista seletivo para GALR2, AR 0,3 nmol/0,2  $\mu$ L (n=10), AR 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=10) e AR 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L (n=5). Os testes tiveram início 20 min após a injeção de AR-M1896 ou salina.

### **3.6.3 EXPERIMENTO 3 - Efeito da GAL intra-MCPD, nas doses de 1,0 e 3,0 nmoleses/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LTE**

Para os testes conduzidos no LTE os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle, que recebeu salina (n= 10) e 2 outros grupos que receberam GAL nas doses de 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=11) e 3,0 nmoleses/0,2  $\mu$ L (n=9). Os animais foram submetidos ao LTE 20 min após a injeção da GAL ou salina, e 30 segundos após a realização da última tarefa de fuga no LTE os mesmos animais ainda foram expostos ao Campo Aberto por 5 min.

### **3.6.4 EXPERIMENTO 4 - Efeito da GAL intra-MCPD, nas doses de 1,0 e 3,0 nmoleses/0,2 $\mu$ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao TCV**

Para condução do TCV os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle, que recebeu salina (n=9); e 2 outros grupos que receberam GAL nas doses de 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=7) e 3,0 nmoleses/0,2  $\mu$ L (n=11). Decorrido 20 min após a injeção da GAL ou salina, os animais foram colocados na caixa do TCV. Durante 3 min os animais puderam explorar livremente a caixa, e a cada 20 lambidas no bebedouro eles foram punidos com um choque de 0,5  $\mu$ A.

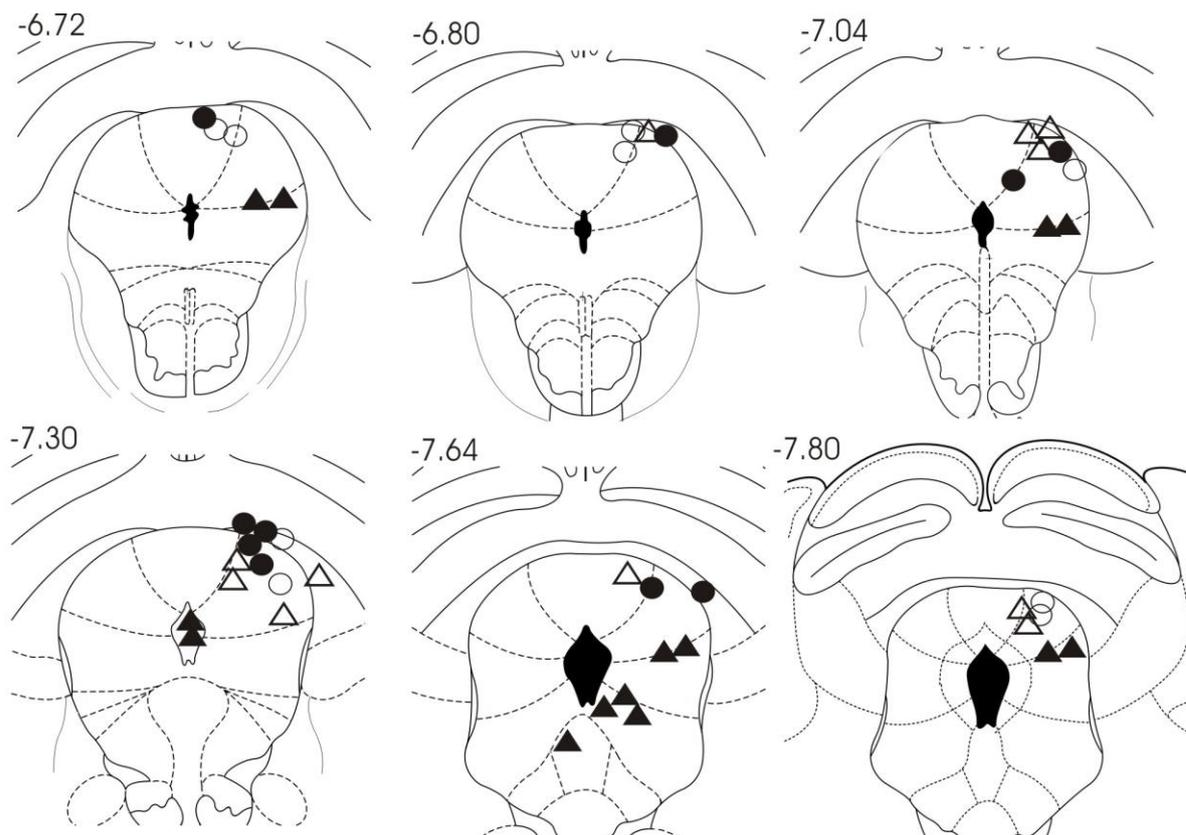
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com o programa de estatística SPSS para Windows (Versão 20.0, IBM). Os comportamentos avaliados no LCE (% entradas BA, % tempo BA e nº entradas BF) e o número de lambidas punidas no TCV foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma via e teste *post hoc* de Dunnett quando apropriado. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

Para avaliar o comportamento nas diferentes esquivas (medidas repetidas) do LTE foi empregada uma ANOVA multivariada (fator esquiva como medida repetida e fator tratamento). No caso de ocorrer efeito do tratamento ou interação entre o tratamento e a medida repetida, foi realizada uma ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett quando apropriado para comparar os diferentes grupos entre si para uma determinada esquiva (basal, esquiva 1 ou esquiva 2). O comportamento de fuga foi analisado através da ANOVA de uma via. Em casos onde não houve homogeneidade de variância entre os grupos, os dados brutos foram transformados para valores em escala logarítmica.

## 4. RESULTADOS

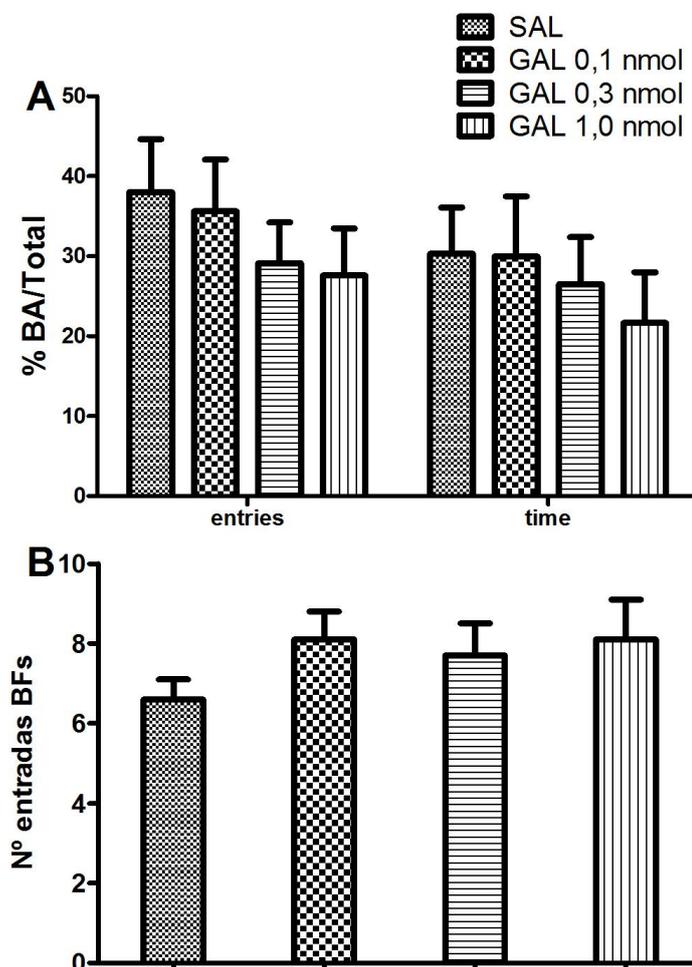
A Figura 7 representa os sítios de injeção na MCP. Animais que tiveram a injeção fora da coluna dorsal foram excluídos da análise.



**Figura 7** - Localização dos sítios de injeção na MCP (bregma -6.72 a -7.80) dos animais utilizados no teste do LTE. As figuras apresentam as coordenadas dos respectivos bregma com base no Atlas de Paxinos e Watson (2009). Símbolos: salina (●), GAL 1,0 nmol (Δ), GAL 3,0 nmoles (○) e excluídos (▲). A média de acertos para os demais testes foi semelhante.

De acordo com o observado no experimento 1, para os animais submetidos ao LCE, a GAL injetada na MCPD não alterou a porcentagem de entradas ( $F_{(3,35)}=0,708$ ;  $p=0,554$ ) e a porcentagem de tempo ( $F_{(3,35)}=0,379$ ;  $p=0,769$ ) nos BAs do LCE. Observa-se ainda que para as doses utilizadas, a GAL não causou alterações

significativas no número de entradas nos BFs ( $F_{(3,35)}=0,773$ ;  $p=0,517$ ), que é um parâmetro para avaliação de atividade locomotora (Figura 8).

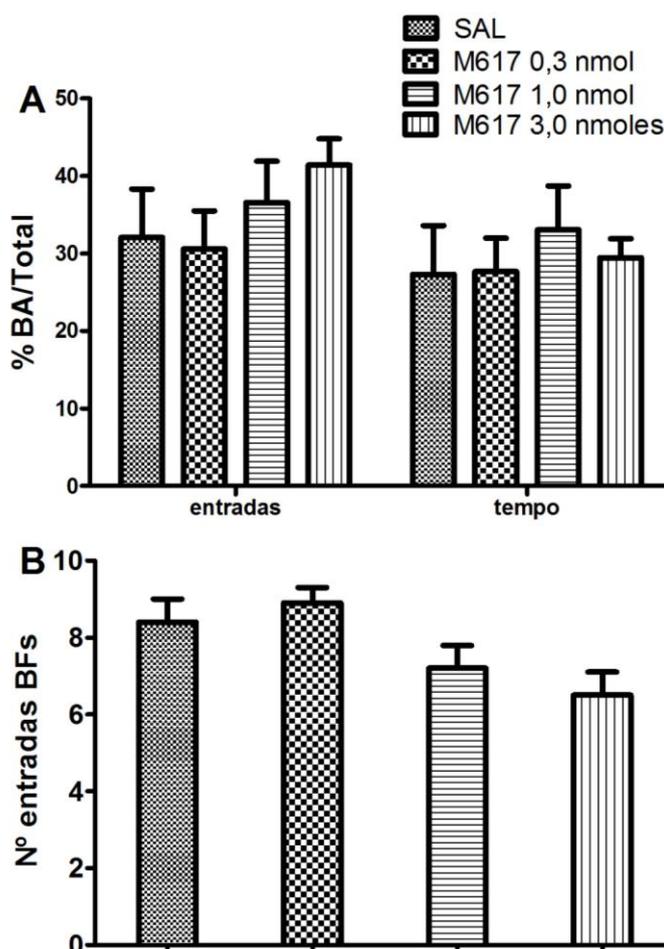


**Figura 8** - Ratos tratados com salina (grupo controle;  $n=11$ ) ou GAL nas doses de 0,1 nmol/0,2  $\mu$ L ( $n=7$ ), 0,3 nmol/0,2  $\mu$ L ( $n=12$ ) ou 1,0 nmol/0,2 $\mu$ L ( $n=9$ ) na MCPD 20 min. antes de serem submetidos ao LCE. (A) Porcentagem de entrada nos braços abertos (BAs) e porcentagem do tempo de permanência também nos BAs (B) Número absoluto de entradas nos braços fechados (BFs). Dados representam a média  $\pm$  EPM.

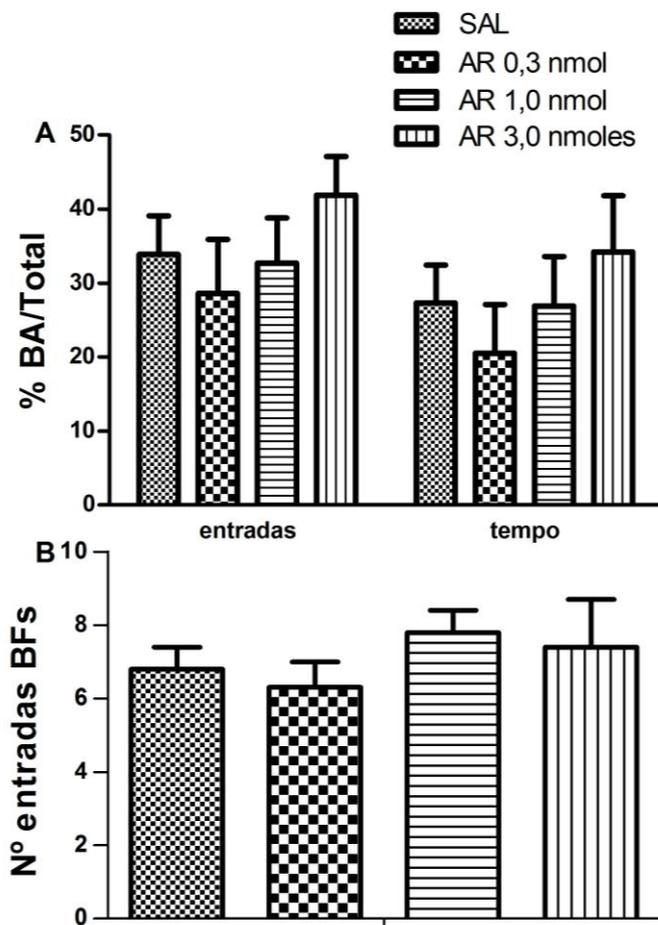
Para o experimento 2, o M617, um agonista seletivo GALR1, intra-MCPD também não alterou os seguintes parâmetros no LCE: porcentagem de entradas nos BAs ( $F_{(3,30)}=0,910$ ;  $p=0,448$ ) e porcentagem de tempo nos BAs ( $F_{(3,30)}=0,278$ ;  $p=0,841$ ). Com a administração da maior dose de M617 (3,0nmoles/0,2 $\mu$ L) houve tendência

para redução do número de entradas nos BFs ( $F_{(3,30)}=3,805$ ;  $p=0,02$ ; Dunnet=0,069) quando comparado com o grupo controle (Figura 9).

O tratamento com AR-M1896, um agonista seletivo GALR2, intra-MCPD não alterou a porcentagem de entradas ( $F_{(3,33)}=0,535$ ;  $p=0,662$ ) e a porcentagem de tempo nos BAs ( $F_{(3,33)}=0,574$ ;  $p=0,636$ ). Para as doses utilizadas do AR-M1896 não houve alteração da atividade locomotora, dado que não houve alteração no número de entradas nos BFs ( $F_{(3,33)}=0,574$ ;  $p=0,636$ ) (Figura 10).



**Figura 9** - Ratos tratados com salina (grupo controle;  $n=8$ ) ou M617 nas doses de 0,3 nmol/0,2  $\mu$ L ( $n=9$ ), 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L ( $n=9$ ) ou 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L ( $n=8$ ) na MCPD 20 min. antes de serem submetidos ao LCE. (A) Porcentagem de entrada nos braços abertos (BAs) e porcentagem do tempo de permanência também nos BAs (B) Número absoluto de entradas nos braços fechados (BFs). Dados representam a média  $\pm$  EPM.



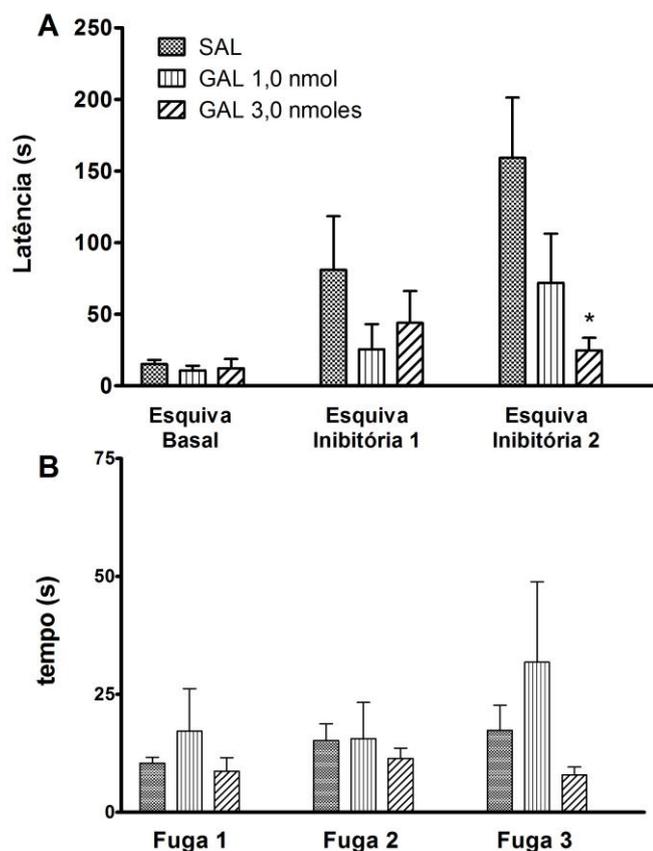
**Figura 10** - Ratos tratados com salina (grupo controle; n=12) ou AR-M1896 nas doses de 0,3 nmol/0,2  $\mu$ L (n=10), 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=10) ou 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L (n=5) na MCPD 20 min. antes de serem submetidos ao LCE. (A) Porcentagem de entrada nos braços abertos (BAs) e porcentagem do tempo de permanência também nos BAs (B) Número absoluto de entradas nos braços fechados (BFs). Dados representam a média  $\pm$  EPM.

A figura 11 mostra os resultados para o LTE 20 minutos após a infusão de GAL na MCPD nas doses de 1,0 e 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L, sendo que a ANOVA multivariada revelou que a esquia inibitória foi adquirida durante o teste ( $F_{(26,2)}=7,25$ ;  $p=0,003$ ), e mostrou ainda um efeito estatisticamente significativo da interação tratamento x esquia ( $F_{(27,2)}=4,35$ ;  $p=0,023$ ). Para análise da esquia inibitória 2 foi realizado primeiramente um tratamento dos dados, calculando-se o *log* desses valores, devido

ao fato do teste de Levene mostrar que não houve homogeneidade de variância para os mesmos. Através da ANOVA de uma via foi revelado que o tratamento com GAL afetou a esQUIVA inibitória 2 ( $F_{(27,2)}=5,18$ ;  $p=0,012$ ). A análise *post hoc* mostrou que a GAL na dose de 3,0 nmoles prejudicou a esQUIVA inibitória 2 se comparada com o grupo salina (Teste de Dunnett,  $p=0,008$ ), e na dose de 1,0 nmol apesar de não ter sido significativa, houve uma tendência em prejudicar a esQUIVA inibitória 2 (Teste de Dunnett,  $p= 0,058$ ).

Uma ANOVA de uma via revelou que o tratamento com a GAL não afetou as três tentativas de fuga no LTE (Fuga 1:  $F_{(27,2)}=0,57$ ;  $p=0,897$ ; Fuga 2:  $F_{(27,2)}=0,17$ ;  $p=0,634$ ; Fuga 3:  $F_{(27,2)}=1,13$ ;  $p=0,338$ ).

A tabela 1 mostra que tanto a GAL de 1,0 quanto a de 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L não alteraram a atividade locomotora ( $F_{(27,2)}=0,619$ ;  $p=0,546$ ) no Campo Aberto imediatamente após o LTE.



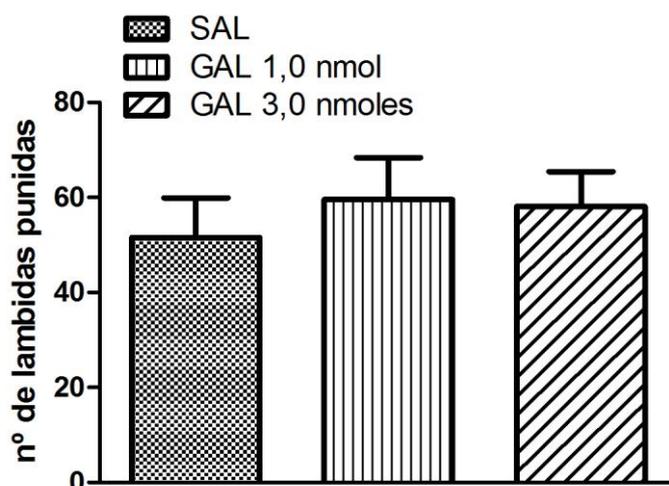
**Figura 11** - Latência na Esquiva Inibitória (A) ou Fuga (B) de ratos tratados intra-MCPD com GAL nas doses de 1,0 nmol/0,2  $\mu$ L (n=11), 3,0nmoles/0,2  $\mu$ L (n=9) ou salina (n=10) 20 minutos antes de serem submetidos ao LTE. Dados representam a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle na mesma esquiva.

**Tabela 1** - Distância percorrida (em cm) por ratos tratados com salina (n=10) ou GAL nas doses de 1,0 nmol (n=11), 3,0nmoles (n=9) intra-MCPD 20 minutos antes de serem submetidos ao LTE e imediatamente após colocados no campo aberto.

Tratamento	Distância Percorrida (cm) *
Salina (n=10)	1528,06 $\pm$ 277,71
GAL 1,0 nmol (n=11)	1480,69 $\pm$ 176,14
GAL 3,0 nmoles (n=9)	1851,88 $\pm$ 303,06

\*Dados representados como média  $\pm$  EPM

Os resultados para a administração de GAL intra-MCPD no TCV estão apresentados na Figura 12, sendo que a análise dos dados através da ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $F_{(24,2)}=0,26$ ;  $p=0,770$ ) para o número de lambidas punidas entre o grupo controle e os grupos que foram tratados com GAL nas doses de 1,0 e 3,0 nmoles/0,2  $\mu\text{L}$ .



**Figura 12** - Número de lambidas punidas para ratos tratados intra-MCPD com GAL nas doses de 1,0 nmol/0,2  $\mu\text{L}$  ( $n=7$ ), 3,0 nmoles/0,2  $\mu\text{L}$  ( $n=11$ ) ou salina ( $n=9$ ) 20 minutos antes de serem submetidos ao TCV. Dados representam a média  $\pm$  EPM.

## 5. DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado nos resultados, a GAL intra-MCPD não alterou o comportamento de ratos submetidos ao LCE. A escolha das doses foi baseada em estudo prévio realizado em nosso laboratório, no qual se observou efeito ansiolítico induzido pela dose de 0,3 nmol e um aumento da atividade locomotora de ratos expostos ao campo aberto após a administração de 1,0 nmol de GAL intra-NDR (SILOTE *et al.*, 2013). Contudo, no presente estudo, não houve diferença significativa no número de entradas nos BFs para os animais que receberam as diferentes doses de GAL (0,1 a 1,0 nmol/0,2µL) intra-MCPD. Uma análise fatorial de ratos expostos ao LCE sugere que o número de entradas nos BFs pode ser empregado como um parâmetro para avaliação da atividade locomotora (CRUZ *et al.*, 1994).

Estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* descreveram a presença do GALR1 e do GALR2 em neurônios da MCP, embora o GALR1 apareça em maior número (O'DONNELL *et al.*, 1999). Sabe-se que esses receptores estão associados a mecanismos de transdução de sinal que levam a respostas efetoras contrárias (KARELSON & LANGEL, 1998; BRANCHEK *et al.*, 2000). Nesse sentido, existem evidências que sugerem que a GAL possa mediar efeitos contrários dependendo do subtipo de receptor galaninérgico ativado. Por exemplo, a GAL e um agonista seletivo para GALR2 prejudicaram e facilitaram, respectivamente, a neurotransmissão serotoninérgica no NDR para animais submetidos ao modelo de eletroconvulsão (MAZARATI *et al.*, 2005). Assim, seria possível que a ativação de GALR1 na MCPD induziria efeito ansiolítico, enquanto a ativação de GALR2 induziria efeito ansiogênico concomitantemente, de forma que os efeitos se anulariam. Para testar essa hipótese, foi avaliado o efeito de ligantes galaninérgicos seletivos para GALR1 (M617) e para GALR2 (AR-M1896) intra-MCPD de ratos submetidos ao LCE. Entretanto, de forma contrária à hipótese inicial, também não houve diferenças estatisticamente significantes no comportamento dos animais tratados com os ligantes seletivos quando comparados aos respectivos grupos controle.

Em relação aos resultados obtidos com a maior dose de M617, observou-se menor exploração dos BFs, que pode ser interpretada como redução da atividade locomotora. Essa redução pode ter prejudicado a detecção de um possível efeito ansiolítico dessa substância, já que a menor atividade locomotora possivelmente levou a uma menor exploração dos BAs também.

Em relação à estrutura em questão, a MCPD de ratos pode não ser recrutada pela simples exposição ao LCE. No estudo de Blundell e Adamec (2006) foram realizados testes de imunorreatividade para a proteína de ligação ao elemento de resposta monofosfato de adenosina cíclica fosforilado (pCREB), uma enzima que tem se apresentado aumentada em várias áreas do cérebro após exposição dos animais a diversos agentes estressores. Para ratos que foram submetidos apenas à exposição ao LCE, não houve variação significativa da imunorreatividade para pCREB, contudo um segundo grupo exibiu comportamento tipo-ansioso, e aumento da imunorreatividade para pCREB nas colunas dorsal e lateral da MCP quando passaram pelo protocolo de exposição ao predador 7 dias antes (BLUNDELL & ADAMEC, 2006). Tal observação sugere uma ativação da MCPD somente em situações onde os níveis de ansiedade estejam elevados.

Por outro lado, Beijamini e Guimarães (2006) observaram que a exposição de ratos ao LCE, assim como a exposição ao predador, aumentaram significativamente o número de células com dupla-marcação c-Fos+NADPH-diaforase (c-Fos age como um marcador imunohistoquímico de atividade neuronal; NADPH-diaforase funciona como marcador histoquímico de neurônios que contêm a enzima NOS) em diferentes regiões do cérebro, dentre elas a MCPdl (BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006a; 2006b), sendo que anteriormente foi verificado que a inibição da enzima Óxido Nítrico Sintase – NOS – na MCPdl induziu um efeito tipo-ansiolítico em ratos expostos ao LCE (GUIMARÃES *et al.*, 1994), o que sugere uma participação dessa região mesencefálica na modulação da ansiedade gerada pelo modelo, por meio da atividade da enzima NOS.

De fato, o papel modulatório da GAL em situações de estresse tem sido relatado. Nas doses de 0,3 e 1,0 mg/Kg (i.p.) este peptídeo foi capaz de prevenir a diminuição da atividade locomotora e exploração do Campo Aberto causada pelo estresse por

restrição em ratos (KLENEROVA *et al.*, 2011). A administração de GAL na amígdala central de ratos também foi capaz de reverter o efeito do estresse por restrição (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002b). Já ratos tratados com M40 intra-BNST antes do procedimento de restrição tiveram redução do efeito ansiogênico observado nos testes de interação social e LCE quando comparados ao grupo somente estressado (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002a). Porém, a administração de M40 em grupos não-estressados não alterou o comportamento dos animais nos mesmos testes, o que sugere um efeito modulatório da GAL somente em situações de estresse e não tonicamente (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002a). Alguns estudos sugerem que a liberação de neuropeptídeos ocorra somente em condições de disparos neuronais de alta frequência (TALLENT, 2008; MAZARATI *et al.*, 2000; KHOSHBOUEI *et al.*, 2002b), sugerindo que a GAL endógena não tenha um papel fisiológico importante em condições basais (CRAWLEY, 2008).

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), característica marcante no TAG e que ocorre em resposta a agentes farmacológicos ansiogênicos (ioimbina, agonistas serotoninérgicos e cafeína, para revisão ver GRAEFF, 2007), parece também ser passível de modulação galaninérgica. Por exemplo, a alarina, peptídeo da família da GAL recentemente descrito, administrada i.c.v., teve efeito anti-depressivo em camundongos com depressão induzida por um protocolo de estresse brando crônico e imprevisível, associado a uma redução dos níveis de RNAm do CRH no hipotálamo, e a uma diminuição dos níveis séricos do CRH, da corticotrofina e de corticosterona, hormônios característicos do eixo HPA (WANG *et al.*, 2014).

Um recente estudo clínico também apoia a relação entre a GAL e seus receptores com o estresse. Voluntários adultos europeus brancos (das cidades de Manchester, RU e Budapeste, HUN) tiveram analisada a contribuição dos genes do sistema galaninérgico para expressão de três diferentes fenótipos relacionados à depressão e ansiedade: relato de depressão ao longo da vida, depressão atual e ansiedade atual. Assim sendo, os genes da GAL e dos três receptores descritos para o sistema galaninérgico (GALR1 a GALR3) não apresentaram interação relevante quando analisada a contribuição direta para a expressão dos fenótipos em questão. Contudo, esses genes demonstraram grande relevância no desenvolvimento de

fenótipos relacionados à depressão e ansiedade quando ligados a eventos estressantes ocorridos tanto na infância, quanto na vida recente adulta, sendo que cada componente contribuiu de forma diferente no aumento da vulnerabilidade às situações de estresse relatadas (JUHASZ *et al.*, 2014).

A relação da GAL e de seus receptores com as consequências comportamentais do estresse indicou a possibilidade de se observar efeitos desse peptídeo na modulação da ansiedade em um modelo experimental que submetesse os animais a uma situação de maior estresse, gerando assim maior nível de ansiedade. Pellow e colaboradores (1985) verificaram que ratos confinados por 20 min. nos BAs do LCE, ao fim do procedimento, tinham níveis de corticosterona significativamente maiores em comparação ao grupo controle (PELLOW *et al.*, 1985). A corticosterona em roedores é equivalente ao hormônio cortisol em humanos, o qual se apresenta em níveis elevados após situações que representam ameaça para o indivíduo. O procedimento do teste no LTE, além de permitir a separação de comportamentos relacionados ao TAG e ao TP, envolve maior estresse, já que 24h antes do teste os animais são submetidos ao procedimento de pré-exposição, que consiste no confinamento do animal em um dos BAs do LTE por um período de 30 min (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

A maior dose (3,0 nmoles/0,2 µL) de GAL injetada na MCPD prejudicou a esquiva inibitória 2 no LTE, o que sugere um efeito ansiolítico. Já na menor dose houve uma tendência a efeito ansiolítico. Esse resultado parece não ser decorrente de um efeito motor inespecífico, considerando que a análise da atividade locomotora realizada no campo aberto não apontou diferença significativa, para a distância total percorrida, entre os grupos em análise. É possível que a MCP seja recrutada durante a tarefa de esquiva do LTE. Nesse sentido, a estimulação química (com injeção de antagonista GABA<sub>A</sub>) ou elétrica da MCP, 30 minutos antes da exposição ao LTE, levou a um efeito tipo-ansiógênico em ratos expostos à esquiva inibitória (CAMPLESI JR. *et al.*, 2012). Contudo, em estudo conduzido por Spiacci e colaboradores foi realizada marcação de proteína Fos, um marcador para avaliação da atividade neuronal, em neurônios da MCP de ratos que foram submetidos somente à tarefa de esquiva inibitória do LTE, com pré-exposição 24h antes do

teste, e não houve marcação de Fos para a região mesencefálica em questão. O mesmo estudo ainda mostrou que a realização da tarefa de fuga gera marcação de Fos para as colunas dorsomedial e dorsolateral da MCP, com correlação negativa entre latência para fuga e marcação de neurônios positivos para Fos, o que demonstra o recrutamento da estrutura para a exibição deste comportamento (SPIACCI *et al.*, 2012). Porém, a GAL administrada intra-MCPD parece não ter efeito panicolítico, pois não alterou a latência da tarefa de fuga nas três tentativas do LTE para as doses utilizadas nesse estudo. Esse resultado corrobora com o estudo prévio de infusão de GAL no NDR, no qual também não se observou efeito panicolítico ou panicogênico desse neuropeptídeo no LTE (SILOTE *et al.*, 2013).

É provável que a seletividade do efeito da GAL no LTE, em relação ao LCE, não se deva a diferença de dose empregada nos dois modelos. Embora a maior dose (3,0 nmoles/0,2 µL) da GAL, que induziu efeito ansiolítico no LTE, não tenha sido testada no LCE, a infusão dos ligantes seletivos para GALR1 e GALR2 em doses altas (3,0 nmoles) também não foi capaz de alterar a exploração dos BAs do LCE. Além disso, a GAL na dose de 1,0 nmol, que no LCE não apresentou nenhum efeito, teve uma tendência ao efeito ansiolítico na esQUIVA 2 do LTE.

Como a GAL é um ligante não seletivo para os receptores GALR1 e GALR2, experimentos complementares terão que ser realizados para definir qual subtipo de receptor está envolvido no efeito ansiolítico da GAL no LTE. Em outras estruturas, como no estriado, no hipocampo e no hipotálamo, a GAL é capaz de reduzir a liberação de GLU, verificada através de estudos *in vitro* (ELLIS & DAVIES, 1994; ZINI *et al.*, 1993; TYSZKIEWICZ *et al.*, 2008). Considerando a importante relação entre o sistema glutamatérgico e a exibição de comportamentos defensivos na MCP, é possível que o efeito ansiolítico da galanina seja mediado pela inibição da neurotransmissão glutamatérgica através da ativação de receptores GALR1. A administração do ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) na MCPdl teve efeito tipansiogênico, aumentando a avaliação de risco e facilitando a esQUIVA inibitória no teste do LTE. Ainda a utilização de uma dose ineficaz do antagonista de receptores NMDA AP7 foi capaz de anular o efeito da maior dose do agonista utilizada (BERTOGLIO & ZANGROSSI JR., 2006). Além disso, Guimarães e colaboradores

em 1991 já haviam observado o efeito ansiolítico da administração de AP7 intra-MCPD no teste do LCE (GUIMARÃES *et al.*, 1991). O AP7 também aumentou o número de lambidas punidas no TCV, quando injetado na MCPdl, o que também sugere um efeito ansiolítico mediado pela inibição da neurotransmissão glutamatérgica (MOLCHANOV *et al.*, 2002).

Por outro lado, não é possível excluir a hipótese de que o efeito da GAL na esquiva inibitória do LTE esteja relacionado à memória, já que essa tarefa envolve um aprendizado por parte do animal, levando a um aumento do tempo de permanência no BF ao longo das três tentativas. Nesse sentido, um estudo de validação do LTE, que propõe o teste como modelo animal para avaliação de ansiedade e memória, foi verificado que o diazepam, uma droga ansiolítica utilizada na clínica, que apresenta entre seus efeitos colaterais a amnésia anterógrada, permaneceu prejudicando a esquiva inibitória três dias após sua administração, o que não foi visto para ipsapirona, um ansiolítico também utilizado na clínica que não exibe muitos dos efeitos colaterais relatados para os benzodiazepínicos, dentre eles a amnésia anterógrada (VIANA *et al.*, 1994). Estudos mais recentes vêm fortalecendo a aplicação do LTE como um modelo para avaliação simultânea da ansiedade e memória, sugerindo que a avaliação das três esquivas seguidas, no dia da administração da droga, se relacionaria com efeitos na ansiedade, e que a medida da esquiva três dias após a administração da droga, se relacionaria com efeitos na memória (ASTH *et al.*, 2012). Concomitantemente, existem estudos relacionando GAL e prejuízo de memória (para revisão WRENN & CRAWLEY, 2001). Um exemplo é a GAL prejudicando a consolidação da memória em ratos submetidos ao Labirinto Aquático de Morris, sendo que paralelamente a isso ocorreu inibição de potenciais de longa duração e a fosforilação de CREB no hipocampo (KINNEY *et al.*, 2009).

Nossos resultados mostraram que a GAL administrada intra-MCPD de ratos, nas doses de 1,0 e 3,0 nmoles/0,2  $\mu$ L, não alterou o número de lambidas punidas no TCV, o que sugere que não houve modulação da GAL tanto sobre a ansiedade quanto na capacidade nociceptiva do animal. Estudo anterior também observou que a GAL intra-MCP empregando as mesmas doses do nosso estudo induziu efeito

analgésico em ratos submetidos ao teste de retirada da pata traseira por estimulação térmica e mecânica (WANG *et al.*, 1999). Contudo, essa analgesia parece não ter sido reproduzida em nosso trabalho. São poucos os estudos com a GAL que utilizam o TCV como modelo de ansiedade, e os resultados são contraditórios. A administração i.c.v. de GAL em ratos aumentou o número de lambidas punidas no TCV (BING *et al.*, 1993). Já a administração local de GAL na ACe induziu efeito ansiogênico para o mesmo modelo (MOLLER *et al.*, 1999).

O LCE e o LTE são modelos baseados no comportamento natural do animal, sendo que as condições aversivas encontradas no ambiente do teste se assemelham às de seu habitat natural. O TCV parte da existência do conflito condicionado operante, que é consequência da inesperada punição que o animal recebe ao buscar água, o que se classifica como “reforço negativo”. Esse teste, diferentemente do LCE e do LTE, envolve uma motivação negativa de evitar o estímulo desagradável, o que pode culminar em níveis de ansiedade elevados se comparado aos outros dois testes empregados neste estudo (CAMPOS *et al.*, 2013).

A ansiedade verificada em um modelo animal pode diferir daquela gerada por outros, considerando que diversos fatores como sua natureza (inata ou aprendida), a sensibilidade do modelo aos efeitos da droga, o ambiente e o substrato neural envolvido podem interferir na expressão do comportamento tipo-ansioso (HANDLEY & MCBLANE, 1993). Nesse sentido, uma análise de correlação entre os níveis de ansiedade exibidos pelos animais nos testes do CA, do LCE e do Vogel mostrou que não há uma correlação significativa entre a ansiedade gerada pelos três modelos (SUDAKOV *et al.*, 2013). Nessa análise não foi empregado o modelo do LTE, porém tais dados sugerem que possivelmente a ansiedade gerada por esse modelo difere daquela observada pelos outros dois em questão no presente estudo. Dessa forma, os diferentes efeitos da GAL intra-MCPD nos modelos aqui empregados podem estar relacionados com maior ou menor intensidade da ansiedade induzida pelos mesmos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a GAL e agonistas seletivos para receptores galaninérgicos (M617 e AR-M1896) não alteraram o comportamento mediado pela MCPD de ratos expostos ao LCE, onde a ansiedade foi avaliada em nível basal.

A GAL induziu efeito tipo-ansiolítico na MCPD de ratos testados no LTE, o que sugere a modulação da ansiedade por esse peptídeo em níveis moderados de ansiedade. Novos estudos serão necessários para determinar qual subtipo de receptor galaninérgico está envolvido nesse efeito.

A GAL não induziu efeito ansiolítico no TCV, um modelo baseado no reforço negativo e que gera altos níveis de ansiedade.

Dessa forma, o presente trabalho reforça e complementa a literatura relativa à participação desse peptídeo nos transtornos de ansiedade, sugerindo ainda que o efeito ansiolítico da GAL, mediado pela MCPD, depende da intensidade da ansiedade induzida pelos diferentes modelos experimentais empregados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5 th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2013.

ANDRADE, L.H.; WANG, Y-P.; ANDREONI, S.; SILVEIRA, C.M.; ALEXANDRINO-SILVA, C.; et al. Mental Disorders in Megacities: Findings from the São Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil. **Public Library of Science ONE**. v.7, n.2, p.1-11, 2012.

ASTH, L.; LOBÃO-SOARES, B.; ANDRÉ, E.; SOARES, V.P.; GAVIOLI, E.C. The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice. **Brain Research Bulletin**. v.87, p.526-533, 2012.

BAILEY, K.R.; PAVLOVA, M.N.; ROHDE, A.D.; HOHMANN, J.G.; CRAWLEY, J.N. Galanin receptor subtype 2 (GALR2) null mutant mice display an anxiogenic-like phenotype specific to the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v.86, n.1, p.8-20, 2007.

BANDLER, R.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**. v.53, p.95-104, 2000.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **TINS**. v.17, n.9, 1994.

BARTFAI, A.M.; KINNEY, J.W.; HILL, M.N.; LU, X.; BIROS, S.; REBEK, J. Jr.; BARTFAI, T. A novel, systemically active, selective galanin receptor type-3 ligand exhibits antidepressant-like activity in preclinical tests. **Neuroscience Letters**. v.405, n.1-2, p.111-115, 2006.

BARRERA, G.; HERNANDEZ, A.; POULIN, J-F.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; MORILAK, D.A. Galanin-Mediated Anxiolytic Effect in Rat Central Amygdala is not a Result of Corelease From Noradrenergic Terminals. **Synapse**. v.59, p.27-40, 2006.

BARTFAI, R.; BEDECS, K.; LAND, T.; LANGEL, U.; BERTORELLI, R.; GIROTTI, P.; CONSOLO, S.; XU, X.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; NILSSON, S. et al. M-15: high-affinity chimeric peptide that blocks the neuronal actions of galanin in the hippocampus, locus coeruleus, and spinal cord. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.88, p.10961-10965, 1991.

BARTFAI, T.; FISONE, G.; LANGEL, U. Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.13, p.312-317, 1992.

BEDECS, K.; BERTHOLD, M.; BARTFAI, T. Galanin – 10 years with a neuroendocrine peptide. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.24, n.4, p.337-349, 1995.

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

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F.S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Research Bulletin**. v.69, p.347–355, 2006a.

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F.S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behavioural Brain Research**. v.170, p.52-61, 2006b.

BELZUNG, C.; PRUT, L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**. v.463, p.3-33, 2003.

BERGER, A.; SANTIC, R.; HAUSER-KRONBERGER, C.; SCHILLING, F.H.; KOGNER, P.; RATSCHEK, M.; GAMPER, A.; JONES, N.; SPERL, W.; KOFLER, B. Galanin and galanin receptors in human cancers. **Neuropeptides**. v.39, p.353-359, 2005.

BERTOGLIO, L.J.; ZANGROSSI JR., H. Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze. **Behavioural Pharmacology**. v.17, p.589-596, 2006.

BING, O.; MOLLER, C.; ENGEL, J.A.; SODERPALM, B.; HEILIG, M. Anxiolytic-like of centrally administered galanin. **Neuroscience Letters**. v.164, p.17-20, 1993.

BITTENCOURT, A.S.; CAROBREZ, A.P.; ZAMPROGNO, L.P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L.C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of n-methyl-d-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**. v.125, p.71-89, 2004.

BLANCHARD, R.J.; FLANNELL, Y.K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v.100, p.101-107, 1986.

BLUNDELL, J., ADAMEC, R. Elevated pCREB in the PAG after exposure to the elevated plus maze in rats previously exposed to a cat. **Behavioural Brain Research**. v.175, p.285-295, 2006.

BRANCHEK, T.A.; SMITH, K.E.; GERALD, C.; WALKER, M.W. Galanin receptor subtypes. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.21, p.109-116, 2000.

BREWER, A.; ECHEVARRIA, D.J.; LANGEL, U.; ROBINSON, J.K. Assessment of new functional roles for galanin in the CNS. **Neuropeptides**. v.39, p.323-326, 2005.

BRUNNER, S.M.; FARZI, A.; LOCKER, F.; HOLUB, B.S.; DREXEL, M.; REICHMANN, F.; LANG, A.A.; MAYR, J.A.; VILCHES, J.J.; NAVARRO, X.; LANG, R.; SPERK, G.; HOLZER, P.; KOFLE, B. GAL<sub>3</sub> receptor KO mice exhibit an anxiety-like phenotype. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**. v.111, n.19, p.7138-7143, 2014.

CAMPLESI JR., M.; DE BORTOLI, V.C.; SOARES, V.P.; 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.

CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.35, p.S101-S111, 2013.

CAROBREZ, A.P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.25, p.52-58, 2003.

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

CASAROTTO, P.C.; TERZIAN, A.L.B.; AGUIAR, D.C.; ZANGROSSI, H.; GUIMARÃES, F.S.; WOTJAK, C.T.; MOREIRA, F.A. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. **Neuropsychopharmacology**. v.37, p.478-486, 2012.

CRAWLEY, J.N. Galanin impairs cognitive abilities in rodents: relevance to Alzheimer's Disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.65, p.1836-1841, 2008.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.49, n.1, p.171-176, 1994.

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**. v.164, n.4, p.1129-1161, 2011.

DRACU L.; LADER M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia - uma interpretação contemporânea da literatura. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**. v.42, p.19-32, 1993.

- ECHEVARRIA, D.J.; HERNANDEZ, A.; DIOGENES, A.; MORILAK, D.A. Administration of the galanin antagonist M40 into lateral septum attenuates shock probe defensive burying behavior in rats. **Neuropeptides**. v.39, p.445-451, 2005.
- FOGAÇA, M.V.; LISBOA, S.F.; AGUIAR, D.C.; MOREIRA, F.A.; GOMES, F.V.; CASAROTTO, P.C.; GUIMARÃES, F.S. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.45, p.357-365, 2012.
- FOGAÇA, M.V.; GOMES, F.V.; MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S.; AGUIAR, D.C. Effects of glutamate NMDA and TRPV1 receptor antagonists on the biphasic responses to anandamide injected into the dorsolateral periaqueductal grey of Wistar rats. **Psychopharmacology**. v.226, p.579-587, 2013.
- FONTANA, D.J.; COMMISSARIS, R.L. Effects of acute and chronic imipramine administration on conflict behavior in the rat: a potential “animal model” for the study of panic disorder? **Psychopharmacology**. v.95, p.147-150, 1988.
- GENTLEMAN, S.M.; FALKAI, P.; BOGERTS, B.; HERRERO, M.T.; POLAK, J.M.; ROBERTS, G.W. Distribution of galanin-like immunoreactivity in the human brain. **Brain Research**. v.505, p.311-315, 1989.
- GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes R, editors: **Handbook of anxiety**, Amsterdam: Elsevier, p.307-354, 1990.
- GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.26, n.1, p.67-70, 1993.
- GRAEFF, F.G. *et al.* The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v.23, p.237-246, 1998.
- GRAEFF, F.G. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.29, p.3-6, 2007.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. Medicamentos anti-ansiedade. In: **Fundamentos da Psicofarmacologia**. São Paulo. Edit. Atheneu, 2012.
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc., 2000.
- GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.12, n.9, p.667-687, 2013.
- GUIMARÃES F.S.; CAROBREZ A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology**. v.103, p.91-94, 1991.

GUIMARÃES, F.S.; AGUIAR, J.C.; DEL BEL, E.A.; BALLEJO, G.O. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**. v.5, p.1929–1932, 1994.

GUIMARÃES, F.S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; LUCCA, A.C.B. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.29, p.1313–1322, 2005.

HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current Opinion in Psychiatry**. v., n.1, p.59-64, 2012.

HOKFELT, T.; TATEMOTO, K. Galanin – 25 years with a multitalented neuropeptide. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.65, p.1793-1795, 2008.

HOLMES, A.; YANG, R.J.; CRAWLEY, J.N. Evaluation of an anxiety-related phenotype in galanin overexpressing transgenic mice. **Journal of Molecular Neuroscience**. v.18, n.1-2, p.151-165, 2002.

HOLMES, A. et al. Galanin Gal-R1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. **Neuropsychopharmacology**. v.28, p.1031-1044, 2003a.

HOLMES, A.; HEILIG M.; RUPNIAK N.M.J.; STECKLER T.; GRIEBEL G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.24, n.1, p.580-588, 2003b.

JACOBOWITZ, D.M.; KRESSE, A.; SKOFITSCH, G. Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography – a historical review. **Peptides**. v.25, p.433-464, 2004.

JARDIM, M.C.; AGUIAR, D.C.; MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.82, p.182-189, 2005.

JUHASZ, G.; HULLAMB, G.; ESZLARIA, N.; GONDA, X.; ANTAL, P.; ANDERSON, I.M.; HÖKFELT, T.G.M.; DEAKIN, J.F.W.; BAGDY, G. Brain galanin system genes interact with life stresses in depression-related phenotypes. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**. p.E1666-E1673, 2014.

KARELSON, E.; LANGEL, U. Galaninergic signalling and adenylate cyclase. **Neuropeptides**. v.32, n.3, p.197-210, 1998.

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

KHOSHBOUEI, H.; CECCHI, M.; MORILAK, D.A. Modulatory effects of galanin in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioural and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuropsychopharmacology**. v.27, p.25-34, 2002a.

KHOSHBOUEI, H.; CECCHIA, M.; DOVEA, S.; JAVORS, M.; MORILAK, D.A. Behavioral reactivity to stress: Amplification of stress-induced noradrenergic activation elicits a galanin-mediated anxiolytic effect in central amygdala. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.71, p.407-417, 2002b.

KIM, K.Y.; KEE, M.K.; CHONG, S.A.; NAM, M.J. Galanin Is Up-Regulated in Colon Adenocarcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**. v.16, p.2373-2378, 2007.

KINNEY, G.A.; EMMERSON, P.J.; MILLER, R.J. Galanin Receptor-Mediated Inhibition of Glutamate Release in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**. v.18, n.10, p.3489-3500, 1998.

KINNEY, J.W.; SANCHEZ-ALAVEZ, M.; BARR, A.M.; CRIADO, J.R.; CRAWLEY, J.N.; BEHRENS, M.M.; HENRIKSEN, S.J.; BARTFAI, T. Impairment of memory consolidation by galanin correlates with in vivo inhibition of both LTP and CREB phosphorylation. **Neurobiology of Learning and Memory**. v.92, p.429-438, 2009.

KLENEROVA, V.; FLEGEL, M.; SKOPEK, P.; HYNIE, S. Galanin modulating effect on restraint stress-induced short- and long-term behavioral changes in Wistar rats. **Neuroscience Letters**. v.502, p.147-151, 2011.

KONKEL, M. J.; LAGU, B.; BOTEJU, L.W.; JIMENEZ, H.; NOBLE, S.; WALKER, M.W. 3-Arylimino-2-indolones are potent and selective galanin GAL3 receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.49, p.3757-3758, 2006.

KORTE, S.M.; DE BOER, S.F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**. v.463, p.163-175, 2003.

KOZLOVSKY, N.; MATAR, M.A.; KAPLAN, Z.; ZOHAR, J.; COHEN, H. The Role of the Galaninergic System in Modulating Stress-Related Responses in an Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**. v.65, p.383-391, 2009.

KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.18, n.1, p.61-67, 1985.

KUTEEVA, E.; WARDI, T.; LUNDSTRÖM, L.; SOLLENBERG, U.; LANGEL, U.; HÖKFELT, T.; OGREN, S.O. Differential role of galanin receptors in the regulation of depression-like behavior and monoamine/stress-related genes at the cell body level. **Neuropsychopharmacology**. v.33, n.11, p.2573-2585, 2008.

LEIBOWITZ, S.F.; KIM, T. Impact of a galanin antagonist on exogenous galanin and natural patterns of fat ingestion. **Brain Research**. v.599, p.148-152, 1992.

LINNMAN, C.; MOULTON, E.A.; BARMETTLER, G.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the field. **NeuroImage**. v.60, p.505-522, 2012.

LIU, H.X.; BRUMOVSKY, P.; SCHMIDT, R.; BROWN, W.; PAYZA, K.; HODZIC, L. Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: Selective actions via GalR1 and GalR2 receptors. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**. v.98, p.9960-9964, 2001.

LU, X.; LUNDSTROM, L.; LANGEL, U.; BARTFAI, T. Galanin receptor ligands. **Neuropeptides**. v.39, p.143-6, 2005a.

LU, X.; LUNDSTROM, L.; BARTFAI, T. Galanin (2-11) binds to GALR3 in transfected cell lines: Limitations for pharmacological definition of receptor subtypes. **Neuropeptides**. v.39, p.165-167, 2005b.

LU, X.; ROSS, B.; SANCHEZ-ALAVEZ, M.; ZORRILLA, E.P.; BARTFAI, T. Phenotypic analysis of GalR2 knockout mice in anxiety- and depression-related behavioral tests. **Neuropeptides**. v.42, p.387-397, 2008.

LUNDSTROM L.; LU, X.; LANGEL U.; BARTFAI, T. Important pharmacophores for binding to galanin receptor 2. **Neuropeptides**. v.39, n.3, p.169-171, 2005a.

LUNDSTROM, L.; SOLLENBERG, U.; BREWER, A.; KOUYA, P. F.; ZHENG, K.; XU, Z. A galanin receptor subtype 1 specific agonist. **The International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. v.11, p.17-27, 2005b.

MATHEUS, M.G.; GUIMARÃES F.S. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal grey induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. **Psychopharmacology**. v.132, p.14-18, 1997.

MAZARATI, A.M.; HOHMANN, J.G.; BACON, A.; LIU, H.; SANKAR, R.; STEINER, R.A.; WYNICK, D.; WASTERLAIN, C.G. Modulation of Hippocampal Excitability and Seizures by Galanin. **The Journal of Neuroscience**. v.20, n.16, p.6276-6281, 2000.

MAZARATI, A.M.; BALDWIN, R.A.; SHINMEI, S.; SANKAR, R. *In vivo* interaction between serotonin and galanin receptors types 1 and 2 in the dorsal raphe: implication for limbic seizures. **Journal of Neurochemistry**. v.95, p.1495-1503, 2005.

MAZARATI, A.; LUNDSTRÖM, L.; SOLLENBERG, U.; SHIN, D.; LANGEL, U.; SANKAR, R. Regulation of kindling epileptogenesis by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors: The effects of subtype-selective agonists and the role of G-

protein-mediated signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.318, n.2, p.700-708, 2006.

MELANDER, T.; HOKFELT, T.; ROKAEUS, A. Distribution of galanin-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**. v.248, p.475-517, 1986a.

MELANDER, T.; HOKFELT, T.; ROKAEUS, A.; CUELLO, A.C.; OERTEL, W.H.; VERHOFSTAD, A.; GOLDSTEIN, M. Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-Hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. **The Journal of Neuroscience**. v.6, n.12, p.3640-3654, 1986b.

MOLCHANOV, M.L, GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**. v.160, p.30-38, 2002.

MOLLER, C.; SOMMER, W.; THORSELL, A.; HEILIG, M. Anxiogenic-like action of galanin after intra-amygdala administration in the rat. **Neuropsychopharmacology**. v.21, n.4, p.507-512, 1999.

MORAES, C.L.K.; 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.194, p.181-186, 2008.

MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.30, p.1466–1471, 2006.

MUFSON, E.J.; COUNTS, S.E.; PEREZ, S.E.; BINDER, L. Galanin plasticity in the cholinergic basal forebrain in Alzheimer's disease and transgenic mice. **Neuropeptides**. v.39, p.233-237, 2005.

NARVÁEZ, M.; MILLÓN, C.; BORROTO-ESCUELA, D.; FLORES-BURGESS, A.; SANTÍN, L.; PARRADO, C.; GAGO, B.; PUIGCERVER, A.; FUXE, K.; NARVÁEZ, J.A.; DÍAZ-CABIALE, Z. Galanin receptor 2-neuropeptide Y Y1 receptor interactions in the amygdala lead to increased anxiolytic actions. **Brain Structure and Function**. 2014.

NESSE, R.M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.23, p.895-903, 1999.

NUTT, D.J. Anxiety and its therapy: Today and tomorrow. In: Briley, M.; File, S.E., eds. **New Concepts in anxiety**. London: Macmillan Press; 1991.

O'DONNELL, D.; AHMAD, S.; WAHLESTEDT, C.; WALKER, P. Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1. **Journal of Comparative Neurology**. v.409, p.469-481, 1999.

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

PARK, J.J.; BAUM, M.J. Intracereboventricular infusion of the galanin antagonist M40 attenuates heterosexual partner preference in ferrets. **Behavioral Neuroscience**. v.113, p.391-400, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2009.

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, p.149-167, 1985.

PIERIBONE, V.A.; XU, Z.D.; ZHANG, X.; HOKFELT, T. Electrophysiologic effects of galanin on neurons of the central nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.863, p.264-273, 1998.

PINHEIRO, S.H.; ZANGROSSI-JR, H.; DEL-BEM, C.M.; GRAEFF, F.G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v.79, n.1, p.71-85, 2007.

POLTRONIERI, C.; ZANGROSSI-JR., H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**. v.147, p.185-192, 2003.

RAJARAO, S.J.R.; PLATT, B.; SUKOFF, S.J.; LIN, Q.; BENDER, C.N.; NIEUWENHUIJSEN, B.W.; RING, R.H.; SCHECHTER, L.E.; ROSENZWEIG-LIPSON, S.; BEYER, C.E. Anxiolytic-like activity of the non-selective galanin receptor agonist, galnon. **Neuropeptides**. v.41, p.307-320, 2007.

SCHEFKE, D.M.; FONTANA, D.J.; COMMISSARIS, R.L. Anti-conflict efficacy of buspirone following acute versus chronic treatment. **Psychopharmacology**. v.99, p.427-429, 1989.

SCHENBERG, L.C.; CAPUCHO, L.B.; VATANABE, R.O.; VARGAS, L.C. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology**. v.159, p.138-144, 2002.

SILOTE, G.P.; ROSAL, A.B.; SOUZA, M.M.; BEIJAMINI, V. Infusion of galanin into the mid-caudal portion of the dorsal raphe nucleus has an anxiolytic effect on rats in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**. v.252, p.312-317, 2013.

SMITH, G.S.; SAVERY, D.; MARDEN, C.; LOPEZ COSTA, J.J.; AVERILL, S.; PRIESTLEY, J.V.; RATTRAY, M. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide,

neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. **Journal of Comparative Neurology**. v.350, p.23-40, 1994.

SOLLENBERG, U.; BARTFAI, T.; LANGEL, U. Galanin--a low-molecular weight ligand of the galanin receptors. **Neuropeptides**. v.39, n.3, p.161-163, 2005.

SOLLENBERG, U.E.; LUNDSTRÖM, L.; BARTFAI, T.; LANGEL, U. M871—A Novel Peptide Antagonist Selectively Recognizing the Galanin Receptor Type 2. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. v.12, n.2, p.115-119, 2006.

SPIACCI JR., A.; COIMBRA, N.C.; ZANGROSSI JR., H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. **Neuroscience**. v.227, p.350-360, 2012.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues Clinical Neuroscience**. v.4, p.123-137, 2002.

SUDAKOV, S.K.; NAZAROVA, G.A.; ALEKSEEVA, E.V.; BASHKATOVA, V.G. Estimation of the Level of Anxiety in Rats: Differences in Results of Open-Field Test, Elevated Plus-Maze Test, and Vogel's Conflict Test. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v.155, n.3, p.295-297, 2013.

SWANSON, C. J.; BLACKBURN, T. P.; ZHANG, X.; ZHENG, K.; XU, Z.Q.; HOKFELT, T. Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (Gal3) antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**. v.102, p.17489-17494, 2005.

SWEERTS, B.W.; JARROT, B.; LAWRENCE, A.J. Expression of preprogalanin mRNA following acute and chronic restraint stress in brains of normotensive and hypertensive rats. **Molecular Brain Research**. v.69, p.113-123, 1999.

TALLENT, M.K. Presynaptic inhibition of glutamate release by neuropeptides: use-dependent synaptic modification. **Results and problems in cells differentiation**. v.44, p.177-200, 2008.

TATEMOTO, K.; ROKAEUS, A.; JORNVAL, H.; MCDONALD, T.J.; MUTT, V. Galanin – a novel biologically active peptide from porcine intestine. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**. v.164, p.124-128, 1983.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI-JR., 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, p.571-576, 2000.

TORREJAIS, J.C.M.; ROSA, C.C.M.; LACERDA, R.B.; ANDREATINI, R. The elevated T-maze as a measure of two types of defensive reactions: A factor analysis. **Brain Research Bulletin**. v.76, n.4, p.376-379, 2008.

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

UNSCHULD, P.G.; ISING, M.; ERHARDT, A.; LUCAE, S.; KOHLI, M.; KLOIBER, S.; SALYAKINA, D.; THOERINGER, C.K.; KERN, N.; LIEB, R.; UHR, M.; BINDER, E.B.; MÜLLER-MYHSOK, B.; HOLSBOER, F.; KECK, M.E. Polymorphisms in the galanin gene are associated with symptom-severity in female patients suffering from panic disorder. **Journal of Affective Disorders**. v.105, n.1-3, p.177-184, 2008.

UNSCHULD, P.G.; ISING, M.; ROESKE, D.; ERHARDT, A.; SPECHT, M.; KLOIBER, S.; UHR, M.; MÜLLER-MYHSOK, B.; HOLSBOER, F.; BINDER, E.B. Gender-specific association of galanin polymorphisms with HPA-axis dysregulation, symptom severity, and antidepressant treatment response. **Neuropsychopharmacology**. v.35, n.7, p.1583-1592, 2010.

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v.49, n.3, p.549-554, 1994.

VOGEL, J.R.; BEER, B.; CLODY, D.E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacology**. v.21, p.1-7, 1971.

WANG, D.; YE, H.; YU, L.; LUNDEBERG, T. Intra-periaqueductal grey injection of galanin increases the nociceptive response latency in rats, an effect reversed by naloxone. **Brain Research**. v.834, p.152-154, 1999.

WANG, M.; CHEN, Q.; LI, M.; ZHOU, W.; MA, T.; WANG, Y.; GU, S. Alaric-induced antidepressant-like effects and their relationship with hypothalamus–pituitary–adrenal axis activity and brain derived neurotrophic factor levels in mice. **Peptides**. v.56, p.163-172, 2014.

WRENN, C.C.; CRAWLEY, J.N. Pharmacological evidence supporting a role for galanin in cognition and affect. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.25, p.283-289, 2001.

XU, Z.Q.; ZHANG, X.; PIERIBONE, V.A.; GRILLNER, S.; HOKFELT, T. Galanin-5-hydroxytryptamine interactions: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors. **Neuroscience**. v.87, p.79-94, 1998.

ZANGROSSI, H. Jr.; 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.

ZINI, S.; ROISIN, M.P.; LANGEL, U.; BARTFAI, T.; BEN-ARI, Y. Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**. v.245, n.1, p.1-7, 1993.