

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

JULIANA DA SILVA MORAIS

**EFEITO DE DIFERENTES AGONISTAS DE RECEPTORES
GALANINÉRGICOS NO NÚCLEO DORSAL DA RAFE DE RATOS
EXPOSTOS A MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE E PÂNICO**

VITÓRIA
2015

JULIANA DA SILVA MORAIS

**EFEITO DE DIFERENTES AGONISTAS DE RECEPTORES
GALANINÉRGICOS NO NÚCLEO DORSAL DA RAFE DE RATOS
EXPOSTOS A MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE E PÂNICO**

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^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres

VITÓRIA
2015

Dedico este trabalho à minha
família, a Juninho e aos meus
amigos.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Vanessa Beijamini Harres, pela sua orientação nesse trabalho, pela sua competência, dedicação e disponibilidade, por compartilhar, sem reservas, todo o seu conhecimento e experiência profissional, além de experiências pessoais, sem dúvida, isso contribuiu imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores que compuseram a banca de avaliação desse trabalho, Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt e Prof. Dr. Roberto Andreatini, pela disponibilidade e importantes contribuições para este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, pela sua contribuição para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg, por permitir a utilização do seu laboratório para a execução de alguns experimentos.

À Prof.^a Dr.^a Valquíria Camim de Bortoli, pelo carinho, por compartilhar seus conhecimentos e pela colaboração na aquisição de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt e sua aluna de mestrado Rafaella Real, pela disponibilidade e pela colaboração na execução dos experimentos de estimulação elétrica.

À doutoranda Cláudia Janaína Torres Muller, por dividir sua experiência e conhecimentos.

À Prof.^a Dr.^a Sâmia Regiane Lourenço Joca, por ter gentilmente cedido uma das drogas utilizadas nos nossos experimentos.

Aos colegas de laboratório, Flávia, Alciene, Thuani, Gabriela, Mayara, Cristina e Johnathan, e aos agregados, João Victor e Thallis, vocês foram fundamentais nessa conquista. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelos momentos de alegria e descontração, pelo apoio e pelas palavras renovadoras.

À Flávia, uma amiga pra toda a vida. Como eu sempre falo: "Você foi um anjo que apareceu na minha vida!" Sou grata pela sua amizade, pelas palavras

certas nos momentos de desânimo e tristeza, pelos conselhos sensatos, pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados e pelas longas conversas. Você e Alciene, cada uma a sua maneira e em diferentes momentos foram muito importantes nessa conquista. Com vocês aprendi a valorizar as verdadeiras amizades.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Lucimar, Camila, Ian e Luana, pelo carinho e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunoistoquímica (LHMI), à coordenadora científica Prof. Dr^a. Cristina Martins e Silva e à técnica Juliana Rabbi pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação, em especial Brunelli, Nadmy, Lorena, Carol e Alexandre, pelo companheirismo e amizade durante toda a minha caminhada.

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

Aos amigos Paula e Clederson pelos momentos de descontração e apoio.

Aos amigos de Guarapari, Vivi, Flavi, Naty, Bela, Rany, Aline, Re e a turma do pilates, Mary, Fábio e Simone. Obrigada pela amizade que surgiu de forma inesperada, mas que me fez muito bem. O apoio e acolhimento que recebi de vocês foi muito importante ao longo dessa jornada.

Aos meus tios e tias, em especial, Tia Finoca, Teté, Tia Sodil e Cida, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

Às minhas queridas primas, Carol, Tico e Márcia, pela amizade. Apesar da distância vocês se fizeram presentes. Obrigada pelo apoio, carinho e preocupação.

À minha querida e admirada Vó Jovita (in memoriam), um exemplo de vida. Seus ensinamentos e sua sabedoria foram essenciais para enfrentar os vários momentos de dificuldade e desânimo. Saudades...

Ao meu irmão Fabricio, meu grande amigo e á minha mãe Ana Lucia, exemplo de mãe e esposa. Vocês contribuíram decisivamente para que eu superasse

todos os obstáculos e momentos difíceis dessa trajetória. Nossa união e cumplicidade me deram forças para sempre seguir em frente. Nossas longas conversas ao telefone me acalentaram e me fizeram mais forte e confiante diante das dificuldades.

Ao meu esposo, Juninho, pela paciência, incentivo e compreensão, por dividir comigo alegrias e decepções, e é claro pelo apoio financeiro. A você minha gratidão por ter me apoiado sempre e de várias maneiras. Que possamos continuar nossa caminhada juntos e fortalecidos no nosso amor.

À Deus, criador de todas as coisas, a Ele que me concedeu a vida. À Maria, nossa mãe, por me guiar, proteger, fortalecer e sempre interceder por mim.

Enfim, a minha eterna gratidão a todos àqueles que acreditaram em mim!

*“O mundo está nas mãos
daqueles que têm coragem de
sonhar, e correr o risco de viver
seus sonhos”.*

Paulo Coelho

RESUMO

A galanina (GAL) é um peptídeo presente no SNC de vários mamíferos, inclusive do homem. Foram clonados 3 receptores diferentes para a GAL, GALR1 e GALR3, inibitórios, e GALR2, excitatório. A distribuição da GAL em estruturas envolvidas com o controle das emoções, assim como estudos comportamentais sugerem que a GAL esteja envolvida na neurobiologia da ansiedade. O seu efeito parece depender tanto do sítio de administração quanto do subtipo de receptor envolvido. O núcleo dorsal da rafe (NDR) destaca-se pela presença de neurônios serotoninérgicos, importantes para mediar o efeito antidepressivo de diversos fármacos. Cerca de 40 % dos neurônios do NDR co-expressam serotonina (5-HT) e GAL. A ativação de GALR1 pelo peptídeo nessa estrutura diminui a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos no NDR. Resultado prévio do nosso laboratório mostrou efeito ansiolítico da GAL intra-NDR de ratos expostos ao Labirinto em T elevado (LTE), mas nenhum efeito na fuga, relacionada ao pânico. Uma das limitações do modelo utilizado é que a fuga (latência para deixar o braço aberto) normalmente ocorre em poucos segundos, de forma que detectar o efeito panicogênico (menor latência de fuga) pode ser difícil. Dessa forma, um dos objetivos do presente estudo foi investigar o efeito da GAL intra-NDR de ratos em outro modelo experimental de pânico, a estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), mais sensível à detecção do efeito panicogênico. Além disso, considerando a existência de diferentes subtipos de receptores galaninérgicos (GALR1 e GALR2) no NDR com mecanismos de transdução opostos, inibitório e excitatório, respectivamente, é possível que a ativação de receptores GALR1 seja responsável por mediar o efeito ansiolítico/panicogênico, enquanto a ativação dos receptores GALR2 induza efeito ansiogênico/panicolítico. Nesse sentido, testamos essa hipótese usando um agonista seletivo para GALR1 (M617) e um agonista seletivo para GALR2 (AR-M1896) no NDR de ratos expostos ao LTE. A administração de M617 intra-NDR facilitou a esQUIVA inibitória nas doses de 1,0 e 3,0 nmoles, sugerindo um efeito tipo-ansiogênico, enquanto a administração do AR-M1896 intra-NDR na dose de 3,0nmoles prejudicou a esQUIVA inibitória, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico, ambos sem alterar a atividade locomotora dos animais testados no

campo aberto. Esses resultados são contrários à hipótese inicial. Também não foi observado efeito dessas drogas no comportamento de fuga do LTE. Posteriormente, foi testado o WAY100635 com o objetivo de verificar se a administração prévia deste antagonista 5-HT_{1A} seria capaz de bloquear os efeitos observados com o agonista GALR2 nos animais submetidos ao LTE. O efeito ansiolítico do AR-M1896 foi atenuado pela administração prévia do WAY100635, na dose de 0,18nmol. Portanto esses resultados sugerem uma relação entre o efeito observado com o AR-M1896, a liberação de 5-HT e a ativação de receptores 5-HT_{1A}. E finalmente, a GAL, na dose de 0,3nmol, aumentou de modo significativo, mas discreto, os limiares de salto e trote dos animais submetidos à estimulação elétrica da MCPD, sugerindo efeito panicolítico. Os resultados, como um todo, apontam que a GAL no NDR participa da mediação de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e, de forma menos evidente, ao Transtorno de Pânico. Os resultados mostram, ainda, que o efeito da GAL na ansiedade nesse subnúcleo depende do subtipo de receptor galaninérgico ativado.

Palavras-chave: Galanina, LTE, NDR, GALR1, GALR2, Ansiedade

ABSTRACT

Galanin (GAL) is a peptide present in the CNS of various mammals, including human being. Three different receptors have been cloned for the GAL, GALR1 and GALR3, inhibitory, and GALR2, excitatory. The distribution of GAL in structures involved in the control of emotions, and behavior studies suggest that GAL may be involved in the neurobiology of anxiety. The effect seems to depend on both the GAL administration site as involved receptor subtype. The dorsal raphe nucleus (DRN) is distinguished by the presence of serotonergic neurons, important to mediate the antidepressant effect of several drugs. About 40% of the neurons of the DRN co-expressing serotonin and GAL. The activation of GALR1 in this structure decreases the firing rate of serotonergic neurons in the DRN. Previous results from our laboratory showed anxiolytic effect of GAL intra-DRN in rats exposed to the elevated T maze (ETM), but no effect on the escape, related to panic. One of the limitations of this model is that the escape (latency to leave the open arm) usually occurs within a few seconds, so that detect panicogenic effect (low latency escape) can be difficult. Thus, one aim of this study was to investigate the effect of intra-DRN rat GAL in another experimental model of panic, electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG), more sensitive to detect panicogenic effect. Furthermore, given the existence of different subtypes of galaninergic receptors (GALR1 and GALR2) in the DRN with opposite transduction mechanisms, inhibitory and excitatory, respectively, it is possible that activation of GALR1 receptors is responsible for mediating the anxiolytic/panicogenic effect while activation of GALR2 receptors induces anxiogenic/panicolytic effect. Accordingly, we tested this hypothesis using a selective agonist for GALR1 (M617) and a selective agonist for GALR2 (AR-M1896) in the DRN in rats exposed to ETM. The administration of M617 1.0 and 3.0 nmol in the DRN facilitated inhibitory avoidance, suggesting an anxiogenic-like effect., while administration of AR-M1896 3,0nmoles in the DRN impaired the inhibitory avoidance, suggesting an anxiolytic-like effect, both without changing locomotor activity of animals tested in the open field. Also there was no effect of these drugs on the ETM escape behavior. Later, the pre-treatment with WAY100635 was tested in order to verify that administration of a 5-HT_{1A} antagonist would be able to block the effects

seen with GALR2 agonist in animals exposed to ETM. The anxiolytic effect of AR-M1896 was attenuated by the prior administration of WAY100635 at a dose of 0,18nmol. Therefore these results suggest a relationship between the observed effect with the AR-M1896, the release of 5-HT and activation of 5-HT1A receptors. And finally, the GAL 0,3nmol intra-DRN increased significantly the jumping and trotting thresholds of animals submitted to electrical stimulation of the DPAG, suggesting a panicolytic effect. Together, the results show that the GAL in the DRN participates in the mediation of behavioral responses related to anxiety and, less clearly, to Panic Disorder. The results also shows that effect of GAL on anxiety depends galaninergic subtype receptor activated.

Keywords: Galanin, T-maze, DRN, GALR1, GALR2, Anxiety

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Distribuição dos principais grupos de células imunorreativas para GAL no SNC de ratos | 22 |
| Figura 2 - Localização do RNAm para GALR1 e GALR2 | 24 |
| Figura 3 - Vias de sinalização para os três subtipos de receptores descritos para a GAL | 25 |
| Figura 4 - Aparato utilizado para os testes do labirinto em t elevado (LTE)..... | 40 |
| Figura 5 - Aparato utilizado para os testes do campo aberto (CA) | 42 |
| Figura 6 - Arena utilizada na estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD)..... | 45 |
| Figura 7 - Fotomicrografia do sítio de injeção no núcleo dorsal da rafe (NDR)..... | 48 |
| Figura 8 - Fotomicrografia do sítio de estimulação na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD)..... | 48 |
| Figura 9 - Representação esquemática mostrando os sítios de injeção no NDR | 49 |
| Figura 10 - Representação esquemática mostrando os sítios de estimulação na MCPD | 50 |
| Figura 11 - Resultados para o M617, intra-NDR, de ratos testados no LTE | 52 |
| Figura 12 - Resultados para o AR-M1896, intra-NDR, de ratos testados no LTE | 54 |
| Figura 13 - Resultados para o pré-tratamento, intra-NDR, com o WAY100635, sobre a injeção do AR-M1896 no NDR de ratos submetidos ao LTE..... | 57 |
| Figura 14 - Resultados para a salina, intra-NDR, de ratos submetidos à estimulação elétrica da MCPD..... | 59 |
| Figura 15 - Desenho esquemático sobre a hipótese da formação de complexos heterorreceptores GALR1/GALR2/5-HT _{1A} | 63 |
| Figura 16 - Desenho esquemático sobre a hipótese da liberação de 5-HT via regulação da neurotransmissão gabaérgica por parte dos receptores GALR1 e GALR2..... | 65 |
| Figura 17 - Desenho esquemático sobre a hipótese da ativação de receptores GALR1 pré-sinápticos nos interneurônios gabaérgicos | 68 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|--|
| 5-HT – Serotonina | GALR1 – Receptor para GAL tipo 1 |
| ACe – Amígdala central | GALR2 – Receptor para GAL tipo 2 |
| ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico | GALR3 – Receptor para GAL tipo 3 |
| ADT - Antidepressivos tricíclicos | HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal |
| BA – Braço aberto | i.c – intracerebral |
| BDZ – Benzodiazepínico | I₅₀ – Intensidade mediana |
| BF – Braço fechado | i.c.v – Intracerebroventricular |
| BSTL – Núcleo do leito da estria terminal | i.p - intraperitoneal |
| CA – Campo aberto | LC – Locus coeruleus |
| CRH – Hormônio liberador de corticotropina | LCE – Labirinto em cruz elevado |
| DSM-V – Manual de diagnóstico e estatística dos transtornos mentais (5 ^a ed.; Associação Psiquiátrica Americana, 2013) | LTE – Labirinto em T elevado |
| GABA – Ácido amino-gama-butírico | MCP – Matéria cinzenta periaquedutal |
| GAL – Galanina | MCPdl - Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral |
| NDR – Núcleo dorsal da rafe | MCPD – Matéria cinzenta periaquedutal dorsal |
| SNC – Sistema nervoso central | |
| TAG – Transtorno de ansiedade generalizada | |
| TP – Transtorno de pânico | |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | ANSIEDADE | 16 |
| 1.2 | MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE | 19 |
| 1.2.1 | Labirinto em T Elevado (LTE) | 20 |
| 1.2.2 | Estimulação Elétrica da MCPD | 21 |
| 1.3 | GALANINA | 22 |
| 1.4 | GALANINA E ANSIEDADE | 27 |
| 1.5 | GALANINA E O NDR | 31 |
| 1.6 | HIPÓTESE | 34 |
| 2. | OBJETIVOS | 36 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 36 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 36 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 | ANIMAIS | 37 |
| 3.2 | DROGAS | 37 |
| 3.3 | IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA E DO ELETRODO | 37 |
| 3.4 | INJEÇÃO E HISTOLOGIA | 38 |
| 3.5 | TESTES COMPORTAMENTAIS | 39 |
| 3.5.1 | Labirinto em T Elevado (LTE) | 39 |
| 3.5.2 | Campo Aberto (CA) | 41 |
| 3.5.3 | Estimulação Elétrica da MCPD | 42 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.6 | GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS | 45 |
| 3.6.1 | EXPERIMENTO 1 - Efeito do M617 intra-NDR, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmol/0,2 µL, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LTE | 45 |
| 3.6.2 | EXPERIMENTO 2 - Efeito do AR-M1896 intra-NDR, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmol/0,2 µL, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LTE | 46 |
| 3.6.3 | EXPERIMENTO 3 - Efeito do pré-tratamento, intra-NDR, com o WAY100635, na dose de 0,18 nmol/0,2 µL, sobre a injeção do agonista GALR2 no NDR de ratos submetidos ao LTE | 46 |
| 3.6.4 | EXPERIMENTO 4 - Efeito da GAL, intra-NDR, na dose de 0,3 nmol/0,2 µL, 10 minutos após a injeção, em ratos submetidos à estimulação elétrica da MCPD | 46 |
| 3.7 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 46 |
| 4. | RESULTADOS | 48 |
| 4.1 | Experimento 1 | 51 |
| 4.2 | Experimento 2 | 53 |
| 4.3 | Experimento 3 | 55 |
| 4.4 | Experimento 4 | 58 |
| 5. | DISCUSSÃO | 60 |
| 6. | CONCLUSÃO | 70 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANSIEDADE

Em 1880, o psiquiatra norte-americano George Miller chamou de neurastenia muitos dos atuais transtornos de ansiedade. Ainda no século XIX, as fobias passaram a ser consideradas como condição médica. Estudos realizados no início do século XX mostraram que há relação direta entre nível de ansiedade e o desempenho em tarefas intelectuais. Entretanto, a partir de certo ponto, 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 (DRACTU& LADER, 1993).

Motivo de discussões para filósofos e pensadores desde a antiguidade, a ansiedade é há muito tempo tema de estudo para a humanidade. 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 ansiedade é entendida como uma mudança de estado fisiológico, psicológico e comportamental devido a uma ameaça ao bem-estar ou à 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, a ansiedade é caracterizada por uma ativação autonômica e neuroendócrina. Ocorre ativação do sistema simpático, com o aumento da frequência e da força de contração do coração, 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).

De modo geral, o quadro de ansiedade é fruto de situações estressantes que acarretam alterações hormonais em consequência da ativação do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal). Neurônios do hipotálamo aumentam a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) que culmina no aumento dos índices sanguíneos de cortisol e demais corticóides produzidos pelas supra-renais (GRAEFF, 2007).

A atual classificação dos Transtornos de Ansiedade que se encontra no Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (5ª ed.; DSM-V; Associação Psiquiátrica Americana, 2013), os Transtornos de Ansiedade estão agrupados de acordo com a semelhança em relação às alterações comportamentais. Dentre estes transtornos se destacam o Transtorno de Pânico (TP) e o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG). Nesta edição, porém, os Transtornos Obsessivos Compulsivos foram separados em um capítulo específico, assim como os Transtornos Relacionados ao Estresse e Traumas (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. Durante tais ataques são observados sintomas como falta de ar, palpitações, dor ou desconforto torácico, asfixia ou sufocação, bem como medo de perder o controle (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012).

O TAG é definido pelo DSM-V 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).

Embora no Brasil dados epidemiológicos sobre prevalência de transtornos de ansiedade sejam escassos, um estudo recente sobre a saúde mental da população de dois bairros da cidade de São Paulo verificou que 29,6% da população apresentou algum dos transtornos mentais descritos no DSM-IV (anterior ao DSM-V), sendo que desses quase 50% relataram algum dos transtornos de ansiedade listados no mesmo manual. Este estudo foi uma iniciativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo que no Brasil a pesquisa foi realizada em São Paulo onde a prevalência de transtornos mentais foi a mais alta registrada em todas as áreas pesquisadas (ANDRADE *et al.*, 2012).

O tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade envolve primariamente alterações na neurotransmissão monoaminérgica ou na GABAérgica. Entretanto, os fármacos disponíveis apresentam limitações consideráveis relacionadas à tolerabilidade e eficácia em parte dos pacientes (para revisão HOLMES *et al.*, 2003b; KOEN *et al.*, 2011).

Assim, entre os fármacos ansiolíticos mais comumente utilizados na clínica destacam-se os benzodiazepínicos (BDZ) que atuam facilitando a ação do neurotransmissor inibitório o ácido amino-gama-butírico (GABA). São indicados no TAG e alguns deles no TP. Uma das vantagens dos BDZ é a indução do efeito ansiolítico agudamente. Porém, os fármacos dessa classe apresentam o inconveniente de afetarem a atividade motora e funções cognitivas, conduzem à tolerância, síndrome de retirada, dependência física e psicológica e potencialização do efeito depressor do etanol e de outros depressores do sistema nervoso central (SNC) (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012).

Uma alternativa ao uso dos BDZ são os fármacos ansiolíticos que interferem na neurotransmissão serotoninérgica, como as azaspironas. A mais estudada é a buspirona, a qual apresenta considerável afinidade por receptores D_2 , marcada afinidade por receptores $5-HT_{1A}$ e promove uma sub-regulação de receptores $5-HT_{2A}$ e $5-HT_{2C}$ pós-sinápticos, o que possivelmente estaria envolvido com o efeito ansiolítico desse fármaco. Esta classe de ansiolíticos é utilizada como agente terapêutico no TAG e não apresenta os inconvenientes dos BZD, porém

o efeito ansiolítico esperado aparece apenas uma a duas semanas após o uso continuado (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012).

Outra classe de fármacos amplamente utilizada nos transtornos de ansiedade é a dos antidepressivos, destacando-se os tricíclicos (ADT) e os inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRSs). Estes últimos figuram como agentes terapêuticos de primeira escolha para o tratamento do TP, visto que estudos controlados relataram efeitos colaterais menos acentuados que aqueles observados para os agentes tricíclicos. Neste caso o efeito ansiolítico possivelmente também se deva à sub-regulação de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} pós-sinápticos. Os ADTs são perigosos se utilizados em altas doses, interagem com barbitúricos e apresentam efeitos adversos acentuados. Já os ISRSs apresentam meias-vidas prolongadas, são relativamente seguros, mas são potentes inibidores de enzimas hepáticas, o que aumenta o potencial de interações farmacológicas e também conduzem à síndrome de abstinência. Além disso, a maior limitação ao uso dos antidepressivos refere-se ao fato do efeito ansiolítico aparecer somente após tratamento crônico (GRAEFF & GUIMARÃES, 2012).

Diante do exposto acima, justifica-se a investigação de possíveis novos alvos terapêuticos para os transtornos de ansiedade. Nesse sentido, destacam-se os neuropeptídeos, como a substância P, o neuropeptídeo Y e a galanina (GAL) (para revisão HOLMES *et al.*, 2003).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Ansiedade e medo podem ser definidos como estados emocionais adaptativos. Enquanto o medo é fruto de uma ameaça definida, na ansiedade a fonte de ameaça é desconhecida. Porém, quando há perda do caráter adaptativo essas emoções se tornam patológicas (CAMPOS *et al.*, 2013). Portanto, os modelos animais de ansiedade são importantes ferramentas na elucidação da etiologia e neurobiologia dos transtornos de ansiedade, assim como para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento destes transtornos. (CRYAN *et al.*, 2011)

Com base nas observações iniciais no que diz respeito ao compartilhamento de características similares na expressão das emoções entre seres humanos e animais, para o estudo dos mecanismos dos transtornos psiquiátricos são utilizados outros mamíferos para tentar reproduzir, pelo menos em parte, em laboratório, características dos transtornos psiquiátricos humanos, de forma a correlacionar alterações comportamentais e fisiológicas. Basicamente, os modelos animais de ansiedade se baseiam em situações conflitantes que podem gerar estados motivacionais opostos induzidos por situações de aproximação/esquiva (CAMPOS *et al.*, 2013).

Os principais modelos de ansiedade utilizados podem ser divididos em duas classes, a saber: testes incondicionados, como por exemplo, Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Labirinto em T Elevado (LTE) e Teste de interação social. Nestes testes as situações de conflitos são consequência de condições aversivas naturalmente presentes no ambiente. Já nos testes condicionados, como por exemplo, Teste de conflito de Vogel, as condições aversivas são inseridas no ambiente, assim o comportamento exibido pelo animal é consequência destas condições (CAMPOS *et al.*, 2013).

Assim, no presente trabalho, foi empregado como modelo de ansiedade/pânico o LTE e como modelo de pânico a estimulação elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPD). E para avaliar o comportamento locomotor foi empregado o campo aberto.

1.2.1 Labirinto em T Elevado (LTE)

O LTE, desenvolvido por Graeff e colaboradores (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; ZANGROSSI & GRAEFF, 1997), foi obtido a partir do refinamento do LCE, uma vez que resultados inconsistentes foram encontrados com outros modelos de ansiedade. O LTE permite avaliar em um mesmo procedimento, dois tipos de ansiedade: medo condicionado/aprendido, representado pela esquiva inibitória e desempenhada no braço fechado (BF) e o medo incondicionado/inato, representado pela fuga e desempenhado nos braços abertos (BAs). Essas respostas têm sido relacionadas ao TAG e TP, respectivamente. Quando colocado no aparato o animal se depara com uma situação aversiva, uma vez que estes animais possuem um medo inato de

ambientes abertos, ocorrendo um aprendizado da esquiva inibitória durante o teste, quando colocados no BF, ao passo que quando colocados nos BAs, os animais podem se direcionar ao BF, o que corresponde a uma resposta de fuga. (ZANGROSSI & GRAEFF, 1997).

Em estudo de validação com drogas ansiolíticas, tanto o agonista BDZ, diazepam, quanto o agonista serotoninérgico, ipsapirona, comprometeram a esquiva inibitória de uma forma dose-dependente. Assim, a esquiva inibitória no LTE pode se relacionar com patologias responsivas a agonistas 5-HT_{1A} ou baixas doses de BDZ como no TAG. Por outro lado, a fuga não é alterada por essas duas drogas, o que pode se relacionar com a ineficácia dessas no tratamento do TP (GRAEFF *et al.*, 1998). Em animais tratados cronicamente com antidepressivos como a fluoxetina, clinicamente eficaz no TP, observa-se um aumento na latência de fuga, sugerindo a relação do comportamento apresentado com esse transtorno de ansiedade (POLTRONIERI *et al.*, 2003).

1.2.2 Estimulação Elétrica da MCPD

A MCPD está envolvida em comportamentos básicos de sobrevivência. Sendo assim, a estimulação elétrica da MCPD, em ratos, simula, em termos comportamentais e autonômicos, um ataque de pânico, uma vez que a estimulação desta estrutura produz um conjunto complexo de comportamentos incondicionados, chamados de “reação de defesa”, que incluem imobilidade, exoftalmia, trote, galope, salto, micção e defecação dos animais (BITTENCOURT *et al.*, 2004).

Em humanos, a estimulação elétrica da MCPD, desencadeia intensos sentimentos de medo e morte iminente, dores generalizadas e alterações autonômicas. Observa-se uma similaridade entre os efeitos autonômicos e comportamentais da estimulação da MCPD e os sintomas do ataque de pânico, sugerindo um modelo experimental de pânico e o envolvimento desta estrutura no desenvolvimento do TP em humanos (CAMPOS *et al.*, 2013).

1.3 GALANINA

A GAL é um neuropeptídeo de 29 a 30 aa (GAL humana possui 30 aa), envolvida com uma extensa variedade de funções biológicas e patológicas, mediadas por 3 subtipos de receptores. Destaca-se sua participação na regulação comportamental, atuação em processos de memória e controle da sensibilidade a dor (LYUDYNO *et al.*, 2006). Este neuropeptídeo apresenta na extremidade C-terminal um resíduo de alanina, responsável por protegê-lo de ataques proteolíticos (LAND *et al.*, 1991^a; BEDESCS *et al.*, 1995) e na extremidade N-terminal um resíduo de glicina, sendo este de crucial importância para a interação com o receptor e conseqüentemente para o desencadeamento das funções biológicas (KAKUYAMA *et al.*, 1997). A GAL é expressa tanto no sistema nervoso central quanto no periférico e também no sistema endócrino, coexistindo com neurotransmissores clássicos e com outros neuropeptídeos (MELANDER *et al.*, 1986; HOKFELT *et al.*, 1987; XU *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2003).

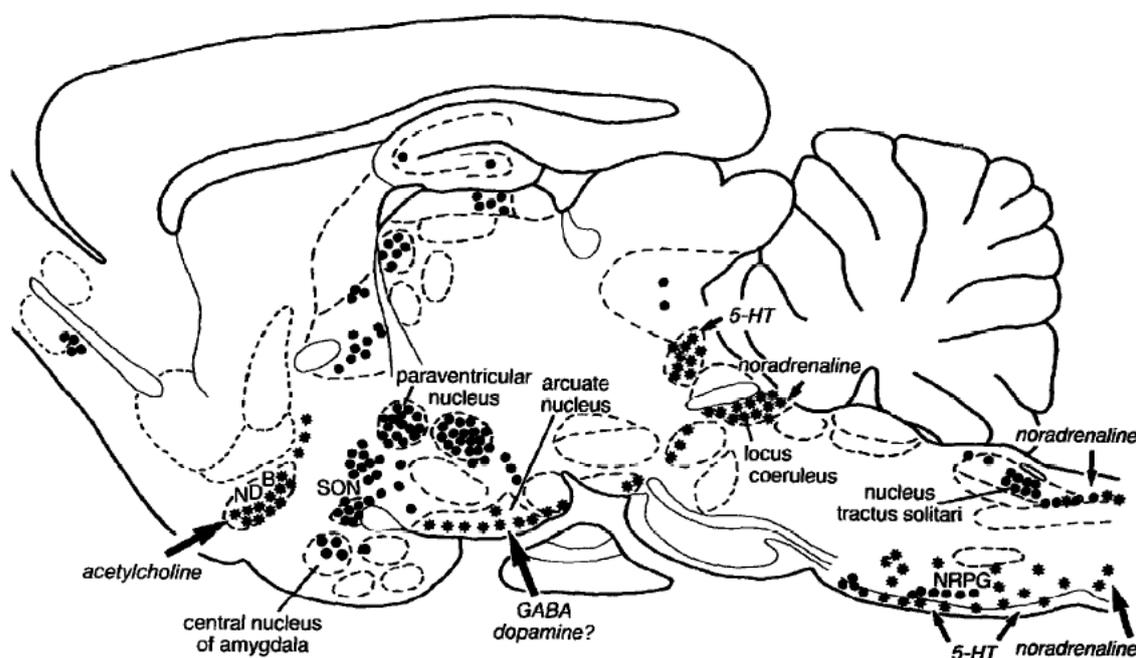


Figura 1 - Distribuição dos principais grupos de células imunorreativas para GAL. Asteriscos indicam a coexistência da GAL com neurotransmissores clássicos. **NDB**, núcleo da banda diagonal; **NRPG**, núcleo reticular paragigantocelular; **SON**, núcleo supraóptico

Fonte: Modificado de BARTFAI *et al.*(1993).

Além da GAL, há ainda mais três compostos relacionados, o GALP, o GMAP e a Alarina (WEBLING *et al.*, 2012).

Os receptores para GAL apresentam substanciais diferenças quanto aos locais de expressão, tanto quanto nas funções e atividades de sinalização.

O receptor para GAL tipo 1 (GALR1) é expresso no sistema nervoso central e no periférico (WATERS and KRAUSE, 2000), sendo detectado no hipocampo, no hipotálamo, na amígdala, no córtex, nos gânglios dorsais sensitivos, no tronco cerebral, incluindo o Lócus Coeruleus (LC), a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e o núcleo dorsal da rafe (NDR), e medula espinhal de ratos (GUSTAFSON *et al.*, 1996; WATERS and KRAUSE, 2000). A sua ativação envolve a inibição da adenilato ciclase via interação com proteína $G\alpha_i/G\alpha_o$, (HABERT-ORTOLI *et al.*, 1994; PARKER *et al.*, 1995) com consequente abertura de canais do tipo GIRK. A ativação do receptor GALR1, pode também levar à ativação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), mediada pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína G_i (WANG *et al.*, 1998). Portanto, GALR1 é considerado um receptor inibitório.

Assim como o receptor GALR1, o receptor para GAL tipo 2 (GALR2) é expresso no sistema nervoso central e periférico. Estudos de imunohistoquímica e hibridização *in situ* identificaram, em maior extensão, sua presença nos gânglios dorsais sensitivos e na medula espinhal de ratos, assim como no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebelar. Foi detectada também sua expressão no sistema olfatório e em vários núcleos do tronco cerebral, como LC, MCP e NDR (O'DONNELL *et al.*, 1999), bem como em vários tecidos humanos. Este receptor é capaz de ativar a via da proteína $Gq/11$, sendo assim considerado um receptor excitatório. A ativação da proteína Gq leva à ativação da fosfolipase C (PLC) e renovação do fosfoinositol intracelular. Como consequência, observa-se a liberação das reservas de Ca^{+} intracelulares para o citoplasma e a abertura de canais de Ca^{+} voltagem dependentes, isso presumivelmente estimula a atividade neuronal e a liberação de neurotransmissores (BARTIFAI *et al.*, 2012).

Ambos os subtipos de receptores, GALR1 e GALR2 estão presentes em neurônios da MCP, porém o GALR1 mostrou maior expressão (O'DONNELL *et al.*, 1999).

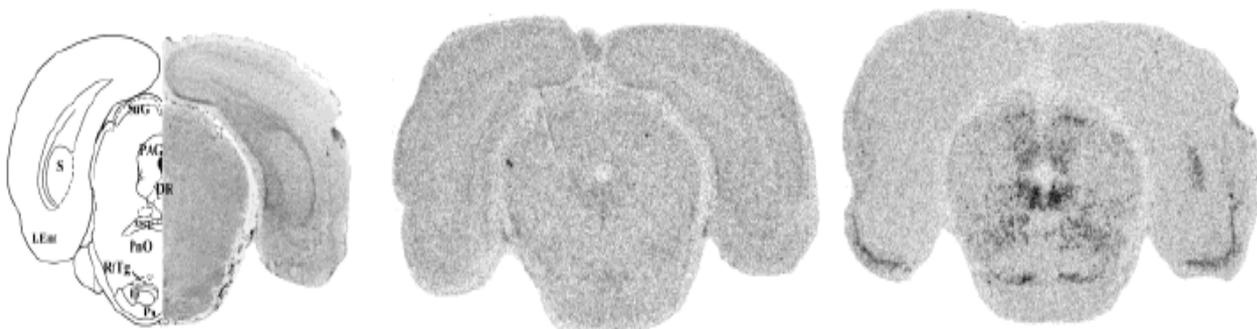


Figura 2 - Auto-radiografia de filmes de hibridização *in situ* mostrando localização do RNAm para GALR1 (plano a direita) e GALR2 (plano central). Painel à esquerda é composto por um diagrama esquemático ilustrando as estruturas neuroanatômicas desse plano cerebral.

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

E finalmente, o receptor para GAL tipo 3 (GALR3) foi primeiramente isolado do DNAc hipotalâmico de ratos e posteriormente de DNAc de humanos, apresentando uma expressão mais restrita se comparada aos demais receptores, ocorrendo a transcrição proeminente no hipotálamo, embora alguns estudos descrevam sua distribuição em outros tecidos do sistema nervoso central e periférico. A expressão deste receptor está ligada à ativação da proteína $G\alpha_i/G\alpha_o$ com inibição de adenilato ciclase e resultando na abertura de canais GIRK (KOLAKOWSKIN *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1998). Dessa forma, o GALR3 é considerado um receptor inibitório.

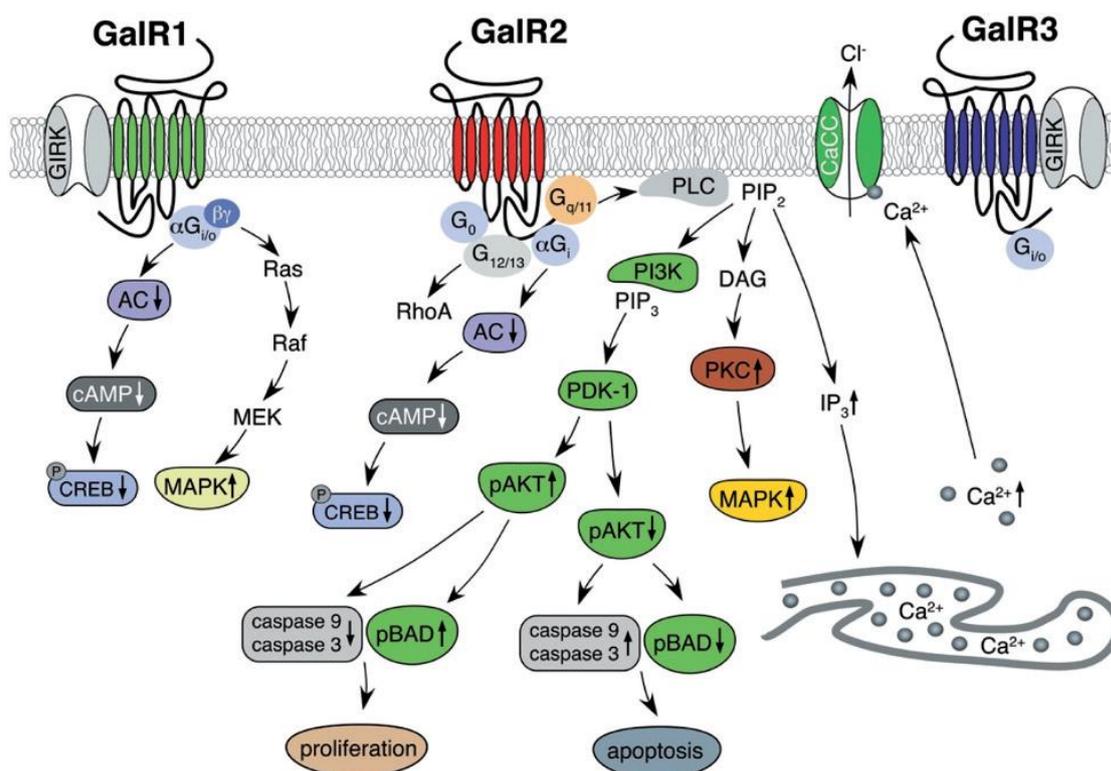


Figura 3 - Vias de sinalização para os três subtipos de receptores descritos para GAL. Fonte: Hökfelt & Tatemoto (2008).

Com o intuito de otimizar os estudos com a GAL, vários ligantes quiméricos tem sido sintetizados a partir da conjugação deste neuropeptídeo com outras moléculas bioativas. Como resultado, tem-se o M15 (BARTFAI *et al.*, 1991), o M32 (WIESENFELD-HALLIN *et al.*, 1992b), o M35 (WIESENFELD-HALLIN *et al.*, 1992b, ÖGREN *et al.*, 1992, KASK *et al.*, 1995), o C7 (BARTIFAI *et al.*, 1992) e o M40 (BARTFAI *et al.*, 1992, 1993). Embora estes ligantes apresentem ação antagonista *in vivo* em doses entre 0,1 e 10nmol quando administrados por via intracerebroventricular (i.c.v) ou intratecal (i.t) (PARKER *et al.*, 1995; LU *et al.*, 2005b), quando administrados em doses maiores que 10nmol, i.c.v ou i.t, apresentam ação agonista parcial *in vivo* (KASK *et al.*, 1995; LU *et al.*, 2005b).

Os ligantes M15, M32, M35 e M40 apresentam afinidade pelos receptores galaninérgicos semelhante à da GAL, porém não apresentam seletividade pelos diferentes receptores (ÖGREN *et al.*, 1992).

O ligante M617 assemelha-se ao M35, porém, devido a uma substituição de um resíduo de glutamina por prolina, apresenta maior seletividade por GALR1 e comporta-se como um agonista (JIMENEZ-ANDRADE *et al.*, 2006).

Já o ligante AR-M1896 é um agonista com maior seletividade por GALR2 (LIU *et al.* 2001). No entanto, estudos recentes indicam afinidade deste ligante também por GALR3 (LU *et al.*, 2005b) e atividade neuroprotetora (ELLIOTT-HUNT *et al.*, 2004).

| PEPTÍDEO | Ki (nM) | | | Ki (GALR1)/Ki (GALR2) | REFERÊNCIA |
|----------|---------|-------|-------|-----------------------------|---|
| | GALR1 | GALR2 | GALR3 | | |
| M1151 | 98.6 | 28.9 | 874 | 3.4 | Saar <i>et al.</i> , 2011 |
| M1152 | 2370 | 36.4 | 656 | 65 | Saar <i>et al.</i> , 2011 |
| M35 | 0.11 | 2.0 | - | 0.055 | Borowsky <i>et al.</i> , 1998 |
| M40 | 2.4 | 4.1 | - | 0.58 | Borowsky <i>et al.</i> , 1998 |
| M617 | 0.23 | 5.7 | - | 0.04 | Lundstrom <i>et al.</i> , 2005b |
| AR-M1896 | 879 | 1.76 | 271 | 500 | Liu <i>et al.</i> , 2001 Lu <i>et al.</i> , 2005b Mazarati <i>et al.</i> , 2006 |

Entre os ligantes não-peptídicos destaca-se o Galnon e o Galmic, porém estes ligantes podem ter seu uso limitado pela interação com múltiplos receptores (FLORÉN *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2005b).

1.4 GALANINA E ANSIEDADE

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. Além disso, a GAL apresenta colocalização neuronal com diversos neurotransmissores envolvidos no controle das emoções (MELANDER *et al.*, 1986b), exercendo, em geral, um efeito inibitório sobre a liberação destes. Como exemplo tem-se a inibição da liberação de glutamato no hipocampo, a de noradrenalina no LC e a de 5-HT no NDR (PIERIBONE *et al.*, 1998).

Estudo de microdiálise revelou que a administração central de GAL induz diferentes efeitos nos níveis extracelulares basais de 5-HT dependendo da via de administração da GAL, i.c (mais especificamente no córtex pré-frontal, hipocampo ventral, amígdala, hipotálamo e estriado) ou i.c.v, e da região cerebral. Neste estudo, a liberação de 5-HT induzida pela GAL se correlacionou com uma densidade forte a moderada de terminais galaninérgicos imunorreativos e com receptores para GAL, no córtex pré-frontal medial, hipocampo ventral e amígdala central. Assim, tanto a administração i.c.v, quanto a i.c reduziram os níveis de 5-HT, de maneira dose-dependente, no hipocampo ventral, enquanto que apenas a administração i.c de GAL reduziu os níveis de 5-HT na amígdala central. Por outro lado, a administração local de GAL no córtex pré-frontal medial aumentou os níveis de 5-HT nesta região, enquanto que a infusão i.c.v revelou efeito oposto. Não foi observado efeito da GAL sobre a liberação de 5-HT no caudado/putâmen e no núcleo hipotalâmico ventromedial, o que se correlaciona com uma baixa densidade de receptores e de terminais galaninérgicos imunorreativos. Para tanto, estes resultados sugerem uma correlação entre os efeitos da administração da GAL na liberação de 5-HT e a distribuição da GAL e seus receptores e ainda, que dependendo da via de administração, efeitos opostos podem ser observados em relação à liberação de 5-HT (YOSHITAKE *et al.*, 2014)

Em seres humanos, foi descrita uma possível relação entre a severidade dos sintomas do TP em mulheres e as variações no gene da GAL (UNSCHULD *et al.*, 2008, UNSCHULD *et al.*, 2010).

Outro estudo recente, em humanos, realizado com pacientes europeus, relacionou alterações genéticas do sistema galaninérgico com distúrbios de humor e ansiedade. Variações em genes que codificam o neuropeptídeo e seus receptores conferem maior probabilidade de se desenvolver quadros de depressão e ansiedade em pessoas que experimentaram situações adversas na infância ou eventos estressantes na vida adulta. Foi observado que tais alterações no sistema galaninérgico têm, inclusive, maior influência nos transtornos de ansiedade do que polimorfismos no gene do transportador de 5-HT (JUHASZ *et al.*, 2014). Portanto, este estudo fortalece a hipótese do envolvimento do sistema galaninérgico na modulação dos transtornos de ansiedade, uma vez que alterações deste sistema conduziu a uma maior vulnerabilidade a estressores psicossociais recentes ou tardios

Diversos estudos pré-clínicos têm investigado a participação da GAL na mediação da ansiedade. Por exemplo, a administração i.c.v. de GAL em ratos induziu efeito ansiolítico no teste de Vogel modificado (BING *et al.*, 1993).

Há também evidências indiretas do papel da GAL na modulação da ansiedade. Por exemplo, camundongos nocaute para GALR1 apresentaram acentuada ansiedade no LCE, além de prejuízo em relação ao medo condicionado (JACOBY *et al.*, 2002).

No mesmo sentido, camundongos nocaute para o receptor GALR2 apresentaram um fenótipo ansiogênico no LCE, sendo que os demais comportamentos avaliados (aprendizado e memória, alimentação e analgesia) não foram significativamente alterados (BAILEY *et al.*, 2007).

Ainda há escassos estudos sobre o receptor GALR3, porém em um recente estudo de caracterização fenotípica, foi observado que camundongos knockout para o receptor GALR3, quando comparados com a linhagem selvagem, apresentaram um fenótipo do tipo-ansiogênico, quando submetidos a alguns testes comportamentais como LCE, campo aberto e teste de exploração claro/escuro. Além disso, foi feita uma análise da expressão da enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese da 5-HT, assim como de receptores e transportador serotoninérgicos, a partir da microdissecação de regiões

cerebrais dos animais knockout para GALR3 e da linhagem selvagem. Neste caso, foi observada uma expressão gênica similar nos animais utilizados, excluindo a influência de alterações do sistema serotoninérgico sobre o fenótipo comportamental observado (BRUNNER *et al.*, 2014).

Estudo recente sugeriu essa participação da GAL e de seus receptores nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse. Assim, durante 21 dias camundongos foram submetidos ao estresse por restrição com posterior análise da expressão da GAL e seus receptores, enzimas participantes das etapas limitantes da biossíntese de monoaminas e autorreceptores monoaminérgicos, no núcleo acumbens, por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real time). Os resultados mostraram que além das alterações comportamentais, foi observada uma elevação da expressão do RNAm da GAL e do receptor GALR1, como consequência do estresse a que os animais foram submetidos. Além disso, o tratamento com a fluoxetina reverteu o aumento da expressão da GAL, e, concomitantemente, elevou a expressão do RNAm para o receptor GALR2 (ZHAO *et al.*, 2013).

A GAL, juntamente com um agonista galaninérgico não-seletivo, o galnon, foram utilizados para avaliar a participação daquele neuropeptídeo em respostas de ansiedade e depressão. Similar à administração i.c.v da GAL, o tratamento agudo com o galnon demonstrou um efeito ansiolítico nos animais experimentais, uma vez que foi observado um aumento no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em zero elevado (LZE) e aumento de travessias das placas no teste das quatro placas. Neste mesmo estudo, o tratamento agudo com o galnon atenuou as mudanças na temperatura basal induzida pelo estresse, consistente com relatos da literatura do efeito ansiolítico da administração da GAL i.c.v no teste de conflito de Vogel. Assim, em conjunto, estes resultados sugerem o papel do sistema galaninérgico mediando efeitos ansiolíticos, uma vez que a reversão destes efeitos, no teste das quatro placas, foi observada a partir da administração do antagonista galaninérgico M35. Ambos, GAL e galnon, não apresentaram efeito antidepressivo nas condições experimentais utilizadas (RAJARAO *et al.*, 2007).

Em um estudo recente envolvendo um teste de medo condicionado, foram avaliados ratos que receberam a GAL intraventricularmente e camundongos transgênicos que apresentavam uma super-expressão da GAL. Assim, utilizando como parâmetro de avaliação o tempo de freezing, ambos os grupos avaliados apresentaram um déficit de aprendizagem e memória quando as tarefas exigiam a participação do hipocampo e da amígdala. Portanto, os resultados sugerem um papel inibitório da GAL sobre os processos cognitivos e apóiam a hipótese de que os déficits induzidos pela GAL são específicos para tarefas cognitivas mais difíceis (KINNEY *et al.*, 2002).

Há ainda evidências de que a GAL inibe a liberação de neurotransmissores envolvidos na aprendizagem e memória, como a acetilcolina, o glutamato, a noradrenalina e a 5-HT no hipocampo de ratos (ZINI *et al.* 1993; KINNEY *et al.* 1998; MAZARATI *et al.* 2001).

Em relação às estruturas envolvidas na modulação da ansiedade pela GAL, os resultados são contraditórios, sugerindo que o efeito desse neuropeptídeo depende do sítio de administração e do modelo de ansiedade utilizado.

Os efeitos moduladores da GAL foram investigados no núcleo central da amígdala (ACe) em relação à responsividade comportamental ao estresse quando a ativação do sistema noradrenérgico foi amplificada por meio da administração intraperitoneal (i.p) do antagonista alfa-adrenérgico, ioimbina. A interação de estímulos estressores, ou seja, quando a resposta noradrenérgica ao estresse por imobilização foi amplificada pelo pré-tratamento com ioimbina, conduziu a uma atenuação do efeito ansiogênico do estressor agudo, sugerindo uma liberação da GAL no ACe. E esta hipótese foi fortalecida quando a administração, antes do estímulo estressor, do antagonista não-seletivo M40 no ACe, bloqueou esse efeito do tipo-ansiolítico observado após o pré-tratamento com a ioimbina sobre a resposta comportamental ao estresse agudo. Além disso, a administração da GAL intra-ACe foi capaz de induzir um efeito ansiolítico durante o estresse que imitava a resposta após o pré-tratamento com a ioimbina, sendo que esse efeito também foi bloqueado pelo antagonista não-seletivo M40. Vale ressaltar que os animais foram submetidos ao LCE para avaliação comportamental. Para tanto, os resultados sugerem que

a amplificação da resposta noradrenérgica ao estresse pode levar à liberação da GAL no ACe, a qual age no sentido de compensar os efeitos ansiogênicos deste neurotransmissor (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002).

Em outro estudo, a administração da GAL no ACe induziu efeito ansiogênico em ratos testados no teste de Vogel modificado, mas não no LCE (MOLLER *et al.*, 1999).

A modulação de respostas comportamentais e neuroendócrinas no núcleo do leito da estria terminal (BSTL) pela GAL foi investigada em ratos submetidos ao estresse agudo por imobilização. O estresse agudo induziu, nos animais, respostas comportamentais do tipo ansiogênica e elevação plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Assim a administração bilateral do antagonista galaninérgico M40 no BSTL, antes da exposição ao estímulo estressor, atenuou a redução do tempo de interação social e aumentou o tempo de exploração dos braços abertos no LCE, além de atenuar a ativação do eixo HPA em cerca de 40%. Dessa forma, estes resultados sugerem que durante o estresse a GAL exerce um efeito modulatório no BSTL, facilitando componentes da resposta comportamental e neuroendócrina ao estresse agudo (KHOSHBOUEI *et al.*, 2002a).

1.5 GALANINA E O NDR

O NDR está entre as estruturas que parecem ser importantes na modulação do comportamento relacionado à ansiedade em ratos (GRAEFF *et al.*, 1996).

Cerca de 50 % dos neurônios do NDR são neurônios serotoninérgicos (KIRBY *et al.*, 2003). Estudos eletrofisiológicos, *in vivo*, observaram uma organização topográfica no plano rostro-caudal dos neurônios serotoninérgicos do NDR, sendo que os neurônios localizados na porção rostral se projetam para regiões específicas do prosencéfalo como caudado/putâmen e substância negra e já aqueles neurônios localizados na porção caudal se projetam para outras áreas do prosencéfalo como córtex, amígdala e hipocampo, sugerindo que estas subpopulações de neurônios possuem propriedades funcionais exclusivas associadas com a modulação de sistemas específicos do prosencéfalo (ABRAMS *et al.*, 2004).

Assim, neurônios serotoninérgicos presentes na porção dorsal e caudal do NDR projetam-se até estruturas prosencefálicas envolvidas no controle emocional, contudo diferentes estímulos estressantes e ansiedade ativam esta população de neurônios facilitando o comportamento do tipo ansiogênico em estruturas como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. Já neurônios serotoninérgicos presentes na porção ventrolateral do NDR e da MCP, região também chamada de “asas laterais” do NDR, exercem um controle inibitório sobre estruturas relacionadas às respostas de luta ou fuga, de forma que o comprometimento desta via conduziria ao transtorno de pânico. E por fim, neurônios serotoninérgicos presentes no núcleo mediano da rafe (NMR) e na porção interfascicular do NDR projetam-se até estruturas prosencefálicas, como hipocampo dorsal e septo/diagonal medial, envolvidas com enfretamento, resiliência e tolerância ao estresse, sendo esta via importante para a patologia da depressão (PAUL & LOWRY, 2013).

Ainda sobre as projeções serotoninérgicas no NDR, estudos revelaram alterações comportamentais, devido a um aumento da atividade serotoninérgica dependente da ação do CRH no NDR, contudo quando um antagonista não-seletivo para o receptor do CRH foi administrado na porção caudal do NDR, este foi capaz de bloquear as alterações comportamentais antes observadas. Assim, a subdivisão dorsomedial do NDR, mais especificamente a porção médio-caudal, tem se mostrado como uma região que pode ter um papel crítico na regulação dos estados de ansiedade crônica e aguda (HAMMACK *et al.*, 2002).

Deakin e Graeff (1991; 1996) postularam a hipótese de um papel dual da 5-HT na ansiedade para conciliar os resultados contraditórios. Segundo essa hipótese, as projeções serotoninérgicas do NDR para a amígdala facilitariam o medo condicionado ou aprendido, enquanto as projeções para a MCP dorsolateral (MCPdl) prejudicariam o comportamento de medo não condicionado ou inato. Nesse sentido, a 5-HT poderia ter um efeito ansiolítico ou ansiogênico dependendo da estrutura e da natureza da ansiedade consideradas. Vários estudos vêm corroborando essa hipótese (ZANGROSSI *et al.*, 2001; MIGUEL *et al.*, 2010). Por exemplo, a lesão dos neurônios serotoninérgicos do NDR resultou em efeito ansiolítico e ao mesmo tempo

panicogênico em animais expostos ao LTE (SENA *et al.*, 2003), um modelo animal que permite avaliar comportamentos tanto de medo condicionado (relacionado TAG) quanto de medo inato (relacionado ao TP ; GRAEFF *et al.*, 2003).

Em um estudo de microdiálise correlacionando eventos neuroquímicos e comportamentais, o aminoácido excitatório ácido kaínico foi capaz de aumentar a liberação de 5-HT na amígdala e na MCPD, com consequente facilitação da esquivia inibitória e prejuízo da tarefa de fuga, consistente com a teoria descrita acima. O agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT e o agonista inverso de receptores BZD, FG 7142 também foram testados, porém não foram capazes de alterar a liberação de 5-HT nas regiões cerebrais citadas (VIANA *et al.*, 1997)

Assim a tabela abaixo resume os resultados obtidos com a GAL, sugerindo que o efeito desse neuropeptídeo depende do sítio de administração e do modelo de ansiedade utilizado.

| Droga | Via | Espécie | Teste/Proced. | Resultado | Referência |
|---------------|------------|----------------|-----------------------------|---|---------------------------------|
| GAL | i.c.v | Rato | Teste de Vogel | Ansiolítico | Bing <i>et al.</i> , 1993 |
| Nocaute GALR1 | - | Camundongo | LCE | Ansiogênico | Jacoby <i>et al.</i> , 2002 |
| Nocaute GALR2 | - | Camundongo | LCE | Ansiogênico | Bailey <i>et al.</i> , 2007 |
| Nocaute GALR3 | - | Camundongo | LCE/Ciclo claro-escuro | Ansiogênico | Brunner <i>et al.</i> , 2014 |
| Galnon | i.p | Camundongo | LZE/Teste das quatro placas | Ansiolítico | Rajarao <i>et al.</i> , 2007 |
| Galnon + M35 | i.p | Camundongo | LZE/Teste das quatro placas | Reversão do efeito ansiolítico | Rajarao <i>et al.</i> , 2007 |
| GAL | Intra-ACe | Rato | Teste de Vogel | Ansiogênico | Moller <i>et al.</i> , 1999 |
| | | | LCE | Sem efeito | Moller <i>et al.</i> , 1999 |
| M40 | BSTL | Rato | LCE pós-estresse | Redução da ansiedade induzida pelo estresse | Khoshbouei <i>et al.</i> , 2002 |
| GAL | NDR | Rato | LTE | Ansiolítico | Silote <i>et al.</i> , 2013 |
| GAL+M40 | NDR | Rato | LTE | Atenuação do efeito ansiolítico | Silote <i>et al.</i> , 2013 |

O NDR também parece ser importante para mediar o efeito ansiolítico/panicolítico de fármacos antidepressivos, uma vez que a inibição dos neurônios no NDR, pela administração de lidocaína, reverteu o efeito panicolítico do tratamento crônico com imipramina na tarefa de fuga do LTE (DOMBROVSKY E ANDREATINI, 2006).

Cerca de 40 % dos neurônios do NDR co-expressam 5-HT e GAL. Dois subtipos de receptores da GAL são expressos no NDR, GALR1 e GALR2, os quais podem ser ativados pela GAL liberada dendriticamente a partir de neurônios serotoninérgicos presentes no NDR (MELANDER *et al.*, 1986; PRIESTLEY *et al.*, 1993) ou a partir de terminais galaninérgicos (XU *et al.*, 1998).

A ativação de GALR1 pelo peptídeo nessa estrutura diminui a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos no NDR (PIERIBONE *et al.*, 1998).

Já o tratamento com fluoxetina durante 14 dias induz aumento do RNAm de GALR2 no NDR de ratos (LU *et al.*, 2005b).

1.6 HIPÓTESE

Considerando a hipótese dual da 5-HT e considerando que a GAL parece diminuir a liberação de 5-HT em regiões relacionadas com a ansiedade, seria possível que a administração de GAL, intra-NDR de ratos, induziria, ao mesmo tempo, efeito ansiolítico e panicogênico. Nesse sentido, estudo anterior de nosso laboratório observou efeito ansiolítico da GAL intra-NDR de ratos expostos ao LTE, mas não efeito panicogênico. Além disso, a administração prévia de um antagonista galaninérgico, o M40, atenuou o efeito ansiolítico induzido pela GAL nesses animais (SILOTE *et al.*, 2013). A participação dos subtipos de receptores galaninérgicos não foi investigada nesse trabalho.

Considerando a expressão de GALR1 e GALR2 no NDR, os quais apresentam mecanismos de transdução opostos, inibitório e excitatório, respectivamente, é possível que a ativação de receptores GALR1 seja responsável por mediar o efeito ansiolítico/panicogênico, enquanto a ativação dos receptores GALR2 induza efeito ansiogênico/panicolítico.

Nesse sentido, testamos a hipótese de que a infusão de M617, um agonista seletivo para GALR1, no NDR de ratos expostos ao LTE, induziria efeito ansiolítico/panicogênico, enquanto a infusão de AR-M1896, um agonista seletivo para GALR2 induziria efeito ansiogênico/panicolítico no modelo testado.

Para testar a hipótese de que esses efeitos dos ligantes galaninérgicos dependem da liberação de 5-HT, realizamos um experimento no qual foi administrado, intra-NDR, o antagonista 5-HT_{1A}, o WAY100635, para verificarmos se o mesmo seria capaz de bloquear os efeitos observados com o agonista GALR2, nos animais submetidos ao LTE. O autorreceptor 5-HT_{1A} no NDR exerce um tônus inibitório sobre a liberação de 5-HT (KIRBY *et al.*, 2003). Assim, a ativação deste receptor promove uma redução da liberação de 5-HT, com consequente efeito do tipo ansiolítico em estruturas como amígdala e hipocampo. Já o bloqueio do receptor 5-HT_{1A}, promove uma desinibição do tônus inibitório, com aumento na liberação de 5-HT e consequente efeito do tipo ansiogênico nas mesmas estruturas citadas anteriormente (FILE *et al.*, 1996; ANDRADE E GRAEFF, 2001).

Uma das limitações desse modelo utilizado, ou seja, o LTE, é que a fuga (latência para deixar o braço aberto) normalmente ocorre em poucos segundos, de forma que detectar o efeito panicogênico (menor latência de fuga) pode ser difícil. Dessa forma, também avaliamos o efeito da GAL intra-NDR de ratos em outro modelo experimental de pânico, a estimulação elétrica da MCP, mais sensível à detecção do efeito panicogênico (SCHENBERG *et al.*, 2001; BERTOGLIO *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o envolvimento dos ligantes de receptores galaninérgicos sobre a modulação do comportamento aversivo em modelos experimentais de ansiedade e pânico no NDR de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a hipótese de que a injeção intra-NDR do M617, um agonista GALR1, induziria efeito ansiolítico/panicogênico em animais expostos ao LTE
- Testar a hipótese de que a injeção do AR-M1896 (agonista GALR2) intra-NDR induziria efeito ansiogênico/panicolítico em animais expostos ao LTE
- Testar a hipótese de que o efeito do agonista GALR2, AR-M1896, depende do tônus serotoninérgico no NDR.
- Testar a hipótese de que a injeção, intra-NDR de GAL, induziria efeito panicogênico em animais expostos à estimulação elétrica da MCPD.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos (280-310 g), provenientes do Biotério Central da UFES mantidos em grupos de 4 por gaiola, à temperatura de 24 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas tendo livre acesso a água e comida. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa universidade (CEUA-UFES) sob número 077/11.

3.2 DROGAS

- Galanina aminoácidos 1-29 (**GAL**; Tocris Bioscience, EUA) na dose de 0,3 nmol/0,2 µL (dose com base no estudo de Silote et al, 2013);
- 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 nmol/0,2 µl (doses com base nos estudos preliminares em nosso laboratório);
- Galanin-(2–11)-amide (**AR-M1896**; Tocris Bioscience, EUA), agonista seletivo dos receptores GALR2, nas doses de 0,3; 1,0; 3,0 nmol/0,2 µl (doses com base nos estudos preliminares em nosso laboratório);
- *N*-{2-[4-(2-metoxi-fenil)-1-piperazinonil]etil}-*N*-(2-piridinil) ciclohexanocarboxamide trihidrocloridrato (**WAY100635**; Sigma-Aldrich, St Louis/MO,USA) antagonista dos receptores 5-HT_{1A} na dose de 0,18nmol/0,2 µL (dose com base nos estudos de DE PAULA SOARES e ZANGROSSI, 2004; DOS SANTOS; *et al.*, 2008).

As drogas utilizadas para os testes foram todas diluídas em salina 0,9 %.

3.3 IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA-GUIA E DO ELETRODO

Os animais foram submetidos, após anestesia com tribromoetanol (250mg/Kg i.p.), à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia de 12 mm de comprimento diretamente no NDR (Coordenadas: Interaural: 0,8 mm; L: 3,2 mm; e DV: 5,5 mm, ângulo de 27°, hemisfério esquerdo) e/ou do eletrodo na

MCPD (Coordenadas: Interaural: 1,6 mm; L: 2,0 mm; e DV: 5,0 mm, ângulo de 15°, hemisfério direito). Antes da incisão, o animal recebeu injeção infiltrativa de lidocaína 2% com vasoconstritor. A cânula e/ou eletrodo foram fixados no crânio do animal com cimento acrílico auto-polimerizante (JET). O mandril foi removido no momento da injeção, e colocado no interior da cânula-guia para evitar problemas com a obstrução e para reduzir contaminação. Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de pentabiótico (0,2 mL por rato) para prevenir infecções e injeção subcutânea de flunixin-meglumina (0,02 mL por rato), um anti-inflamatório, para reduzir o 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 14,0 mm de comprimento no interior da cânula guia, até atingir o NDR 2,0 mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha foi conectada a uma microsseringa Hamilton de 10 µl através de um segmento de polietileno (P10). A infusão foi realizada com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), com uma velocidade de 0,2 µl/min para todas as drogas. Após os experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com uretana 25% (10mL/Kg i.p.), e através da mesma cânula pela qual foi administrada a droga foi injetado o volume de 0,1 µl/min do 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 no formol por no mínimo 3 dias. Após esse período procedeu-se o corte dos encéfalos, com o auxílio de um criostato (Leica), em seções coronais de 50µm no Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) da UFES. Esses cortes foram analisados em microscópio, localizando os sítios de injeção ou posicionamento do eletrodo de acordo com os diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2007).

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 Labirinto em T Elevado (LTE)

Este modelo, derivado do LCE, foi 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 3 braços de iguais dimensões (50x10 cm), sendo um deles cercado por uma parede de 40 cm de altura (braço fechado - BF), perpendicular aos outros 2 cercados apenas por uma aresta de 0,5 cm (BAs). Inicialmente, os animais foram pré-expostos a um dos BAs do LTE por 30 minutos e, 24 horas depois testados. A pré-exposição se mostrou necessária dado que os resultados do LTE para seleção de possíveis drogas para serem utilizadas no tratamento do TP só foram possíveis com o acréscimo desse novo procedimento. Esta modificação resultou na diminuição da latência de saída do BA, sugerindo que com a pré-exposição o caráter exploratório é diminuído, consequência da habituação ao novo ambiente a que o animal foi submetido, ou seja, os animais fogem do perigo e não apenas caminham em direção ao BF (TEIXEIRA *et al.*, 2000; POLTRONIERI *et al.*, 2003; ZANGROSSI *et al.*; 2014). Os parâmetros avaliados estão descritos a seguir.

Esquiva inibitória: os animais são colocados no BF e são realizadas 3 tentativas sucessivas (esquiva basal, esquiva inibitória 1 e esquiva inibitória 2) nas quais se mede o tempo para os animais deixarem o BF (medida de acordo com GRAEFF *et al.*, 1993).

Fuga: trinta segundos após a esquiva inibitória, os animais são colocados na extremidade de um dos BAs e são realizadas três tentativas sucessivas, nas quais se mede o tempo para os animais deixarem o 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 o teste no LTE, os animais foram colocados em um campo aberto para avaliação da atividade locomotora por 5 minutos.

As análises comportamentais foram realizadas por um experimentador treinado e cego ao tratamento que cada animal recebeu.

Assim o que se espera de um fármaco ansiolítico seria uma redução da latência da esquiva inibitória no LTE, já um fármaco panicolítico conduziria a um aumento da latência de fuga no LTE, e isso foi observado em um estudo de validação farmacológica, empregando o LTE e as drogas ansiolíticas, diazepam, buspirona e ritanserin, o qual mostrou um prejuízo da esquiva inibitória, sugerindo um efeito ansiolítico, sem alteração na fuga. Porém neste mesmo estudo, a imipramina, um antidepressivo tricíclico, administrada cronicamente, foi capaz reduzir a latência de fuga, sugerindo um efeito panicolítico (TEXEIRA *et.al.*, 2000).

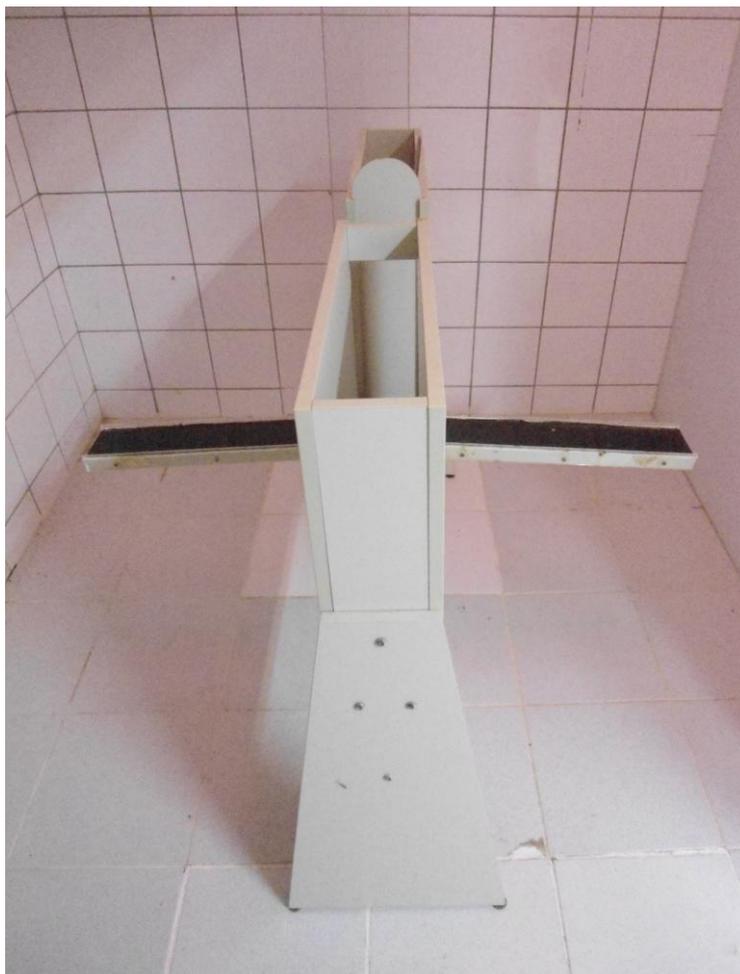


Figura 4 - Foto ilustrativa do aparato utilizado para os testes do Labirinto em T Elevado (LTE).

3.5.2 Campo Aberto (CA)

O campo aberto foi primeiramente descrito por Hall, em 1941, como uma arena circular utilizada para testar as consequências de um novo ambiente sobre o comportamento de ratos.

Este teste é utilizado principalmente para mensurar o comportamento locomotor e exploratório em animais experimentais, uma vez que há uma facilidade para realização do registro comportamental. Neste caso, o animal se locomove com o intuito de explorar um novo ambiente, e essa movimentação é mensurada, sendo, portanto um indicador de atividade exploratória (HALL, 1941).

De acordo com estudo conduzido por Torrejais e colaboradores os modelos experimentais LTE e CA mensuram diferentes aspectos comportamentais, uma vez que, a locomoção central no CA pode ser considerada um índice de ansiedade para avaliação do efeito de drogas ansiolíticas, contudo a esquivia no LTE não se correlaciona com a locomoção central no CA, sugerindo que estes dois modelos avaliam diferentes dimensões comportamentais (TORREJAIS *et.al.*; 2008). Assim faz-se necessária a utilização de outros testes comportamentais, como o CA, além do LTE, pois, por exemplo, ao se testar uma droga dita ansiolítica, a redução do tempo de latência no BF pode ser devido a uma alteração da atividade locomotora, conduzindo a um resultado falso-positivo.

O aparato utilizado neste teste consistiu em uma caixa quadrada de madeira com piso branco de 1 m² de área. Este piso é delimitado por 4 paredes de 30 cm de altura que limitam a fuga. O teste no campo aberto foi executado 30 segundos após o término da realização do LTE com o mesmo animal. No teste os animais foram posicionados no centro do aparato e, durante 5 minutos, puderam explorá-lo livremente. Neste estudo utilizamos o software ANY-maze versão 4.98 para Windows (Stoelting Company, Wood Dale, IL, EUA) o qual é capaz de calcular a distância percorrida pelo animal, assim como a velocidade desenvolvida durante o teste. Os animais testados, de cor clara, foram colocados contra o fundo negro da caixa e para melhor desempenho do

programa, o sistema foi usado como padrão para sensibilidade de contraste através do parâmetro “Highest sensitivity”.



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

3.5.3 Estimulação Elétrica da MCPD

O procedimento utilizado foi o descrito por Schenberg e colaboradores (2001). As estimulações elétricas foram realizadas em uma arena de acrílico (BAS, mod. MD 1500). Na parte superior da arena existe um conector elétrico giratório de mercúrio conectado ao estimulador, o qual gera uma corrente senoidal e frequência constante. A corrente elétrica aplicada foi monitorada através de um osciloscópio ligado ao aparelho estimulador. Um cabo flexível se encaixa ao eletrodo fixado ao crânio do animal, permitindo a passagem de corrente elétrica para a MCPD. No sétimo dia após a cirurgia foram iniciadas as sessões de estimulação elétrica visando à determinação do limiar de fuga de cada animal. Primeiramente, o cabo flexível foi conectado ao eletrodo e o animal foi colocado na arena por 10 minutos para adaptar-se às condições experimentais. Realizou-se uma triagem para determinação do limiar de fuga (limiar aversivo), a qual foi iniciada com a apresentação de estímulos elétricos de 5 μ A, a uma frequência de 60 Hz. Os estímulos elétricos duraram 30

segundos e foram intercalados por intervalos de 60 segundos, após os quais um novo estímulo foi aplicado ao animal até que este apresentasse as respostas de galope e de salto, que melhor caracterizam o comportamento de fuga. O limiar de fuga foi considerado como a menor intensidade de corrente elétrica capaz de induzir a fuga. Nos casos em que não foi observada a fuga até a intensidade de corrente elétrica de 110 μ A, o animal foi excluído do experimento. Vinte quatro horas após a triagem, a GAL ou salina foram administrados no NDR e o limiar de fuga foi redeterminado 10 minutos após a injeção. Este tempo foi reduzido, uma vez que este experimento se mostrou mais longo. Apesar desta alteração, os níveis de GAL ainda foram mantidos, já que a meia-vida da GAL é de 100min (LAND *et.al.*, 1991), assegurando assim seu efeito. Para avaliação comportamental dos animais, foi utilizado um etograma comportamental do rato, conforme descrito por Bittencourt *et al.*, 2005, o qual contém os itens comportamentais:

Dormir – Postura horizontal com olhos fechados e sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.

Repouso – Postura horizontal com olhos abertos ou semi-abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros, e/ou rebaixamento da cabeça e pescoço.

Olfação – Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas.

Esquadrinhar – Exploração visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfação.

Autolimpeza – Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas (“rato sentado”), acompanhada da manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.

Levantar – Postura ereta com extensão das patas posteriores.

Marcha – Locomoção lenta do animal com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.

Exoftalmia – Abertura máxima dos olhos que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz e protusão do globo ocular.

Imobilidade Tensa – Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, frequentemente acompanhado, da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular.

Trote – Locomoção rápida do animal na arena mantendo o padrão da marcha.

Galope – Locomoção muito rápida na arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.

Saltos – Impulso vertical em direção à borda da arena.

Defecação – Eliminação de fezes.

Micção – Eliminação de urina

Assim o que se espera de um fármaco panicolítico é que haja um aumento dos limiares das respostas de fuga e o contrário é esperado para fármacos panicogênicos. Nesse sentido, um estudo conduzido por Schenberg e Vargas mostrou que o tratamento crônico com antidepressivos, como a clomipramina aumenta os limiares de imobilidade, trote, galope, salto e micção, efeito interpretado como panicolítico (VARGAS & SCHENBERG, 2001).

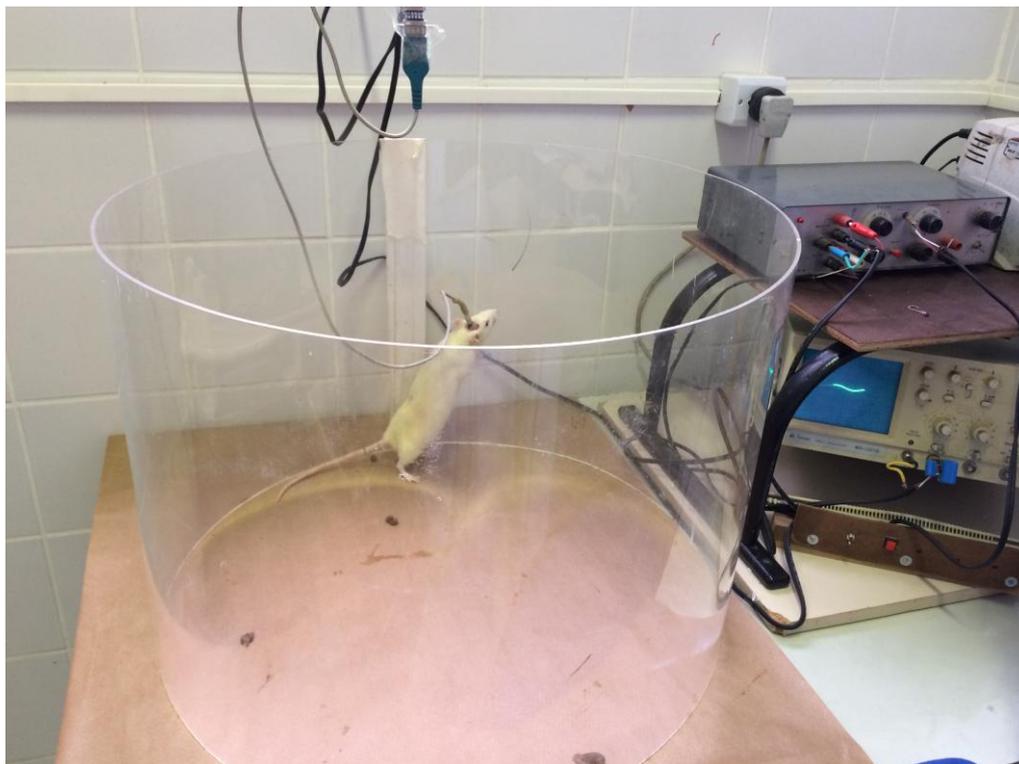


Figura 6 - Foto ilustrativa da arena utilizada na estimulação elétrica da MCPD

3.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS

3.6.1 EXPERIMENTO 1 - Efeito do M617 intra-NDR, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmol/0,2 μ L, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LTE

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle, que recebeu salina (grupo controle; n=13); e mais 3 grupos que receberam o agonista seletivo para GALR1 em três doses diferentes, M617 0,3 nmol/0,2 μ L (n=12), M617 1,0 nmol/0,2 μ L (n=12) e M617 3,0 nmoles/0,2 μ L (n=5) no NDR. Os animais foram submetidos ao LTE 20 min após a injeção do M617 ou salina.

3.6.2 EXPERIMENTO 2 - Efeito do AR-M1896 intra-NDR, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmol/0,2 µL, 20 minutos após a injeção, em ratos submetidos ao LTE

Os animais foram divididos, inicialmente em 4 grupos: grupo controle, que recebeu salina (grupo controle; n=11); e mais 3 grupos que receberam o agonista seletivo para GALR2 em três doses diferentes, AR-M1896 0,3 nmol/0,2 µL (n=8), AR-M1896 1,0 nmol/0,2 µL (n=9) e AR-M1896 3,0 nmol/0,2 µL (n=13) no NDR. Os animais foram submetidos ao LTE 20 min após a injeção do AR-M1896 ou salina.

3.6.3 EXPERIMENTO 3 - Efeito do pré-tratamento, intra-NDR, com o WAY100635, na dose de 0,18 nmol/0,2 µL, sobre a injeção do agonista GALR2 no NDR de ratos submetidos ao LTE

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle, que recebeu salina/salina (grupo controle; n=9); grupo controle que recebeu WAY/salina (grupo controle; n=10); grupo que recebeu salina/AR-M1896 (n=11) e o grupo que recebeu WAY/AR-M1896 (n=12), sendo que a dose do agonista GALR2 foi de 3,0 nmoles/0,2 µL. A injeção do antagonista foi realizada 10 min antes da injeção do agonista ou salina. Os animais foram submetidos ao LTE 20 minutos após a última injeção.

3.6.4 EXPERIMENTO 4 - Efeito da GAL, intra-NDR, na dose de 0,3 nmol/0,2 µL, sobre os limiares das reações de defesa, 10 minutos após a injeção, em ratos submetidos à estimulação elétrica da MCPD

Os animais foram divididos em 2 grupos: grupo controle, que recebeu salina (grupo controle; n=13) e o grupo que recebeu GAL na dose de 0,3 nmol/0,2 µL (n=12). Os animais foram submetidos à estimulação elétrica 10 min após a injeção da GAL ou salina.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o programa de estatística SPSS para Windows (Versão 20.0). Para avaliar o efeito do M617 e do AR-M1896 no comportamento nas diferentes esquivas do LTE (medidas repetidas), assim

como o efeito do pré-tratamento com o WAY100635, sobre a injeção do AR-M1896, foi empregada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias (fator esquiva como medida repetida e fator tratamento). Nos casos em que ocorreu efeito do tratamento ou interação entre o tratamento e a medida repetida, foi realizada uma ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Dunnett ou Tukey, para comparar os diferentes grupos tratados com o grupo controle ou entre si para uma determinada esquiva (basal, esquiva 1 ou esquiva 2). O comportamento de fuga do LTE e os dados do campo aberto foram analisados através da ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Dunnett.

As análises dos limiares das respostas individuais de defesa obtidas nas várias estimulações da MCPD (triagem e teste) entre si para um mesmo grupo foram realizadas por meio de ajuste logístico das frequências acumuladas de resposta em função dos logaritmos das intensidades de corrente, e comparadas através de teste de coincidência por razão de verossimilhanças (chi-quadrado (χ^2) para os ajustes logísticos significantes). Foi empregado teste t para amostras independentes, para a comparação entre o grupo controle e grupo que recebeu a GAL, utilizando a diferença percentual, antes e após a microinfusão de GAL ou salina. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os dados foram representados como I_{50} (intensidade mediana) \pm erro padrão (EP).

As figuras 9 e 10 representam os sítios de injeção no NDR e de estimulação elétrica da MCPD, respectivamente, dos animais testados no presente estudo.

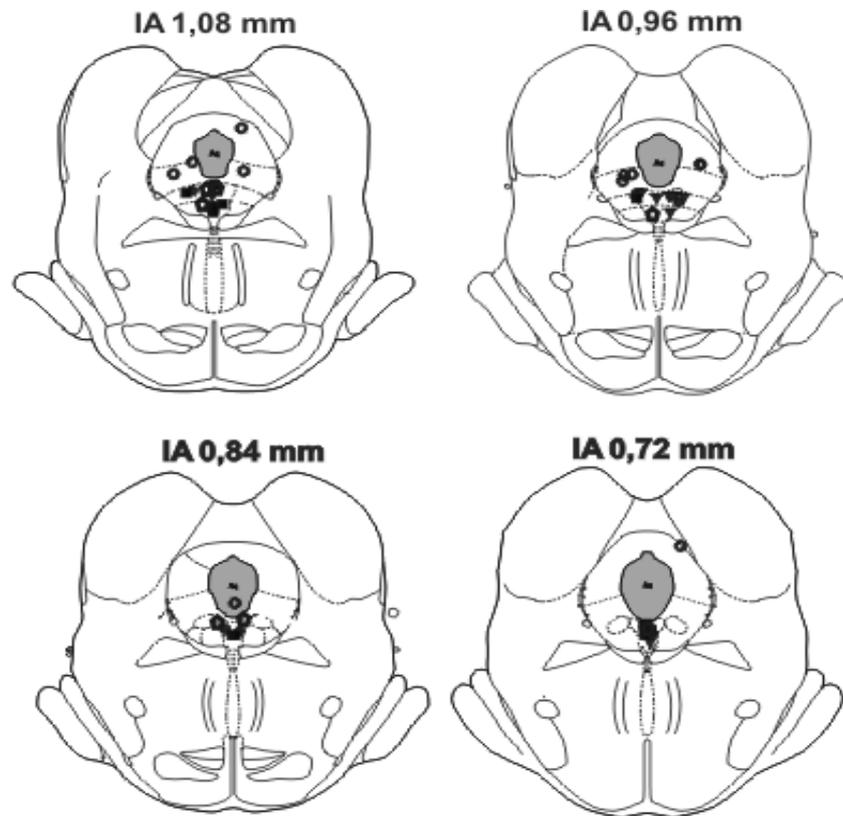


Figura 9 - Representação esquemática de cortes coronais de cérebros de ratos (Paxinos e Watson,2007), mostrando os sítios de injeção no NDR dos animais testados nos experimentos 1, 2,3 e 4. Devido às sobreposições, o número de pontos representados é menor do que o número de animais tratados (●M617,▼AR-M1896, ◆GAL). Os círculos abertos (○) representam inserções fora do NDR.

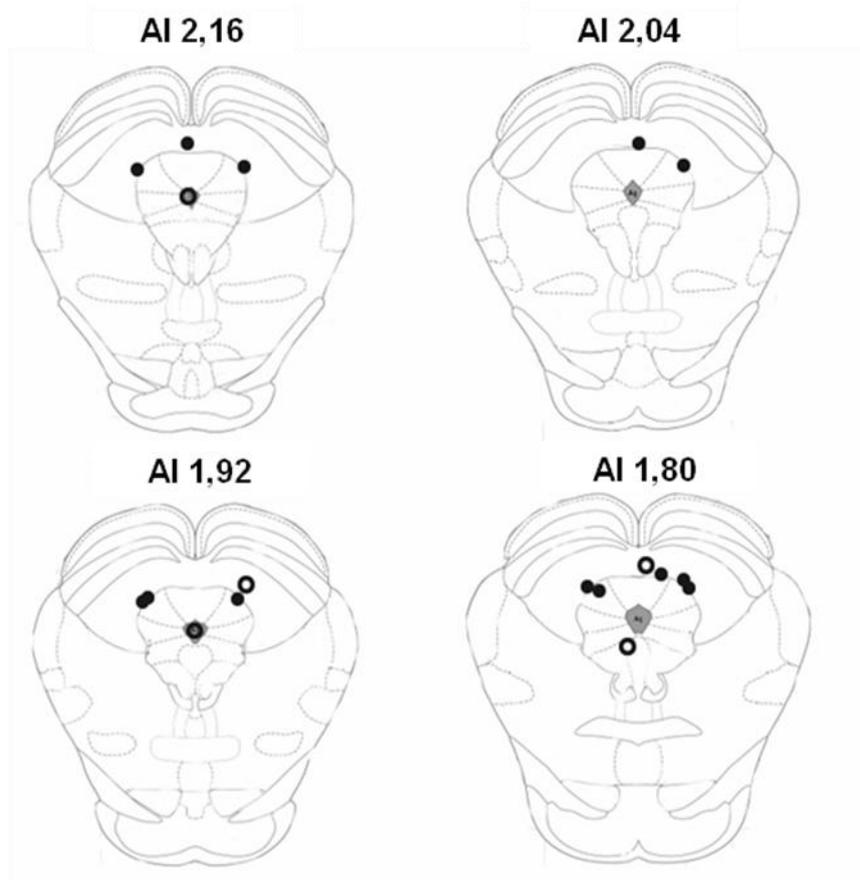


Figura 10 - Representação esquemática de cortes coronais de cérebros de ratos (Paxinos e Watson,2007), mostrando os sítios de injeção na MCP dos animais testados no experimento 4. Devido às sobreposições, o número de pontos representados é menor do que o número de animais submetidos à estimulação elétrica. Os círculos abertos (○) representam inserções fora da MCPD.

4.1 Experimento 1

Os resultados da injeção do M617 no NDR nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/0,2 μ L são mostrados na figura 11. A ANOVA de medidas repetidas revelou que ocorreu aprendizado da esQUIVA inibitória durante o teste ($F_{(2,39)} = 37,40$; $p < 0,0001$) e mostrou um efeito estatisticamente significativo da interação tratamento x esQUIVA ($F_{(3,40)} = 3,78$; $p = 0,018$) e do tratamento ($F_{(3,40)} = 3,35$; $p = 0,028$). A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento com M617 afetou a esQUIVA inibitória 2 ($F_{(3,40)} = 4,07$; $p = 0,013$), mas não a esQUIVA inibitória 1 ($F_{(3,40)} = 1,30$; $p = 0,286$). A análise *post hoc* revelou que o M617 nas doses de 1,0 e 3,0 nmoles facilitou a esQUIVA inibitória 2 se comparado com o grupo salina (Teste de Dunnett, $p = 0,025$ e $p = 0,010$, respectivamente).

Uma ANOVA de uma via revelou que o tratamento com M617 não afetou as três tentativas de fuga no LTE (Fuga 1: $F_{(3,40)} = 0,154$; $p = 0,927$; Fuga 2: $F_{(3,40)} = 0,352$; $p = 0,788$; Fuga 3: $F_{(3,40)} = 1,020$; $p = 0,394$).

A tabela 1 mostra que o tratamento com M617 nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles não alterou a atividade locomotora dos animais se comparado com o grupo salina ($F_{(3,40)} = 0,892$; $p = 0,454$).

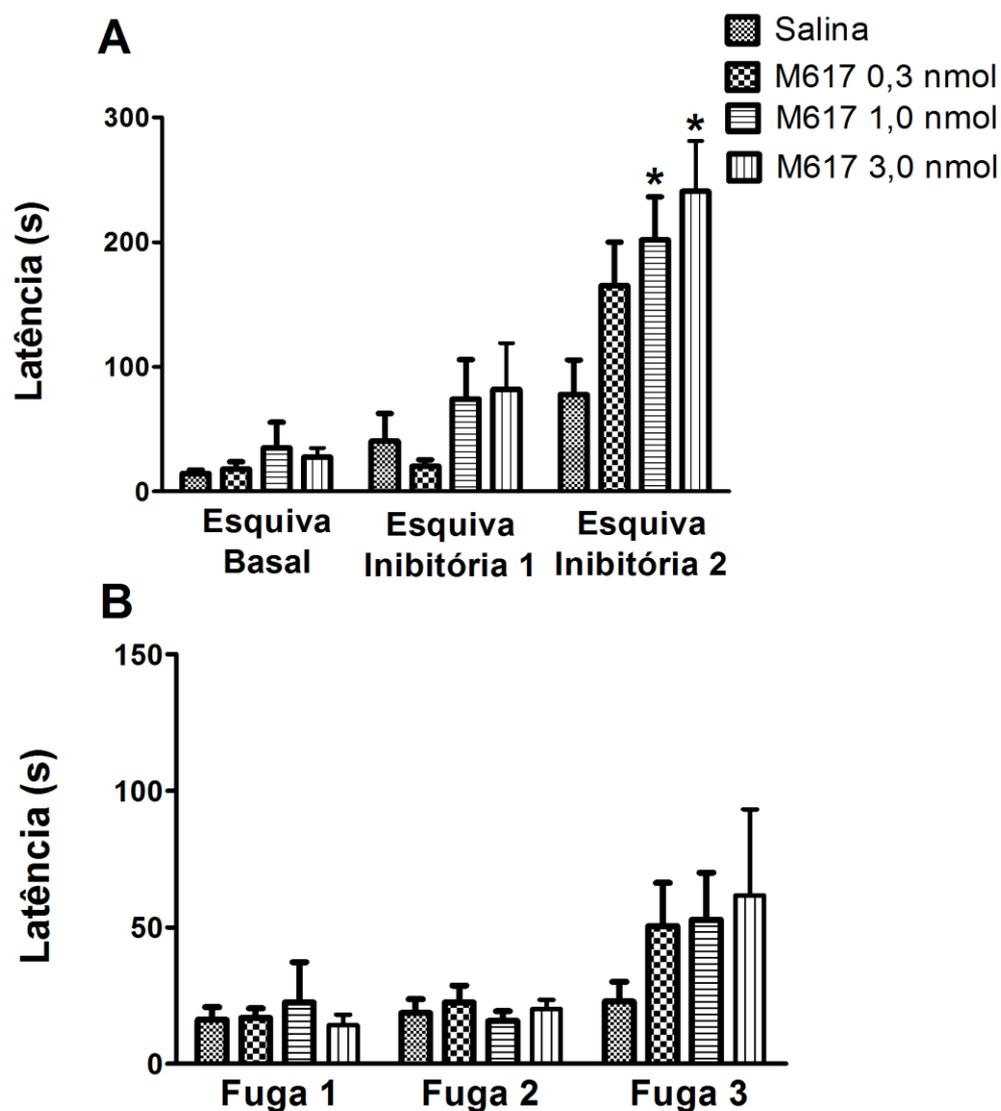


Figura 11 - Latência na Esquiva Inibitória (A) ou fuga (B) de ratos tratados com M617 nas doses de 0,3nmol (n=12) ou 1,0nmol (n=12) ou 3nmoles (n=7) ou salina (n=13) 20 minutos antes de serem submetidos ao LTE. Dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina na respectiva esquiva (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett).

Tabela 1. Distância percorrida no CA (em m) de ratos tratados com salina (n=13) ou M617 nas doses de 0,3nmol (n=12) ou 1,0nmol (n=12) ou 3,0nmoles (n=5) intra-NDR 20 minutos antes de serem submetidos ao LTE e imediatamente após colocados no campo aberto.

| Tratamento | Distância Percorrida (m) * |
|---------------------|-----------------------------------|
| Salina (n=13) | 18,70 ± 2,86 |
| M617 0,3nmol (n=12) | 13,57 ± 2,48 |
| M617 1,0nmol (n=12) | 18,62 ± 3,11 |
| M617 3,0nmol (n=7) | 13,98 ± 3,72 |

*Dados representados como média ± EPM

4.2 Experimento 2

Os resultados da injeção do AR-M1896 no NDR nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles/0,2 µL são mostrados na figura 12. A ANOVA de medidas repetidas revelou que ocorreu aprendizado da esQUIVA inibitória durante o teste ($F_{(2,36)} = 27,93$; $p < 0,0001$) e mostrou um efeito estatisticamente significativo da interação tratamento x esQUIVA ($F_{(3,37)} = 7,00$; $p = 0,001$). Não foi observado efeito estatisticamente significativo do tratamento ($F_{(3,37)} = 1,76$; $p = 0,172$). A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento com AR-M1896 afetou a esQUIVA inibitória 2 ($F_{(3,37)} = 4,99$; $p = 0,005$), mas não a esQUIVA inibitória 1 ($F_{(3,37)} = 0,81$; $p = 0,495$).

A análise *post hoc* revelou que o AR-M1896 na dose de 3,0nmoles prejudicou a esQUIVA inibitória 2 se comparado com o grupo salina (Teste de Dunnett, $p = 0,036$).

Uma ANOVA de uma via revelou que o tratamento com AR-M1896 não afetou as três tentativas de fuga no LTE (Fuga 1: $F_{(3,37)} = 0,14$; $p = 0,937$; Fuga 2: $F_{(3,37)} = 0,29$; $p = 0,828$; Fuga 3: $F_{(3,37)} = 0,43$; $p = 0,733$).

A tabela 2 mostra que o tratamento com AR-M1896 nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 nmoles não alterou a atividade locomotora dos animais se comparado com o grupo salina ($F_{(3,37)} = 1,54$; $p = 0,220$).

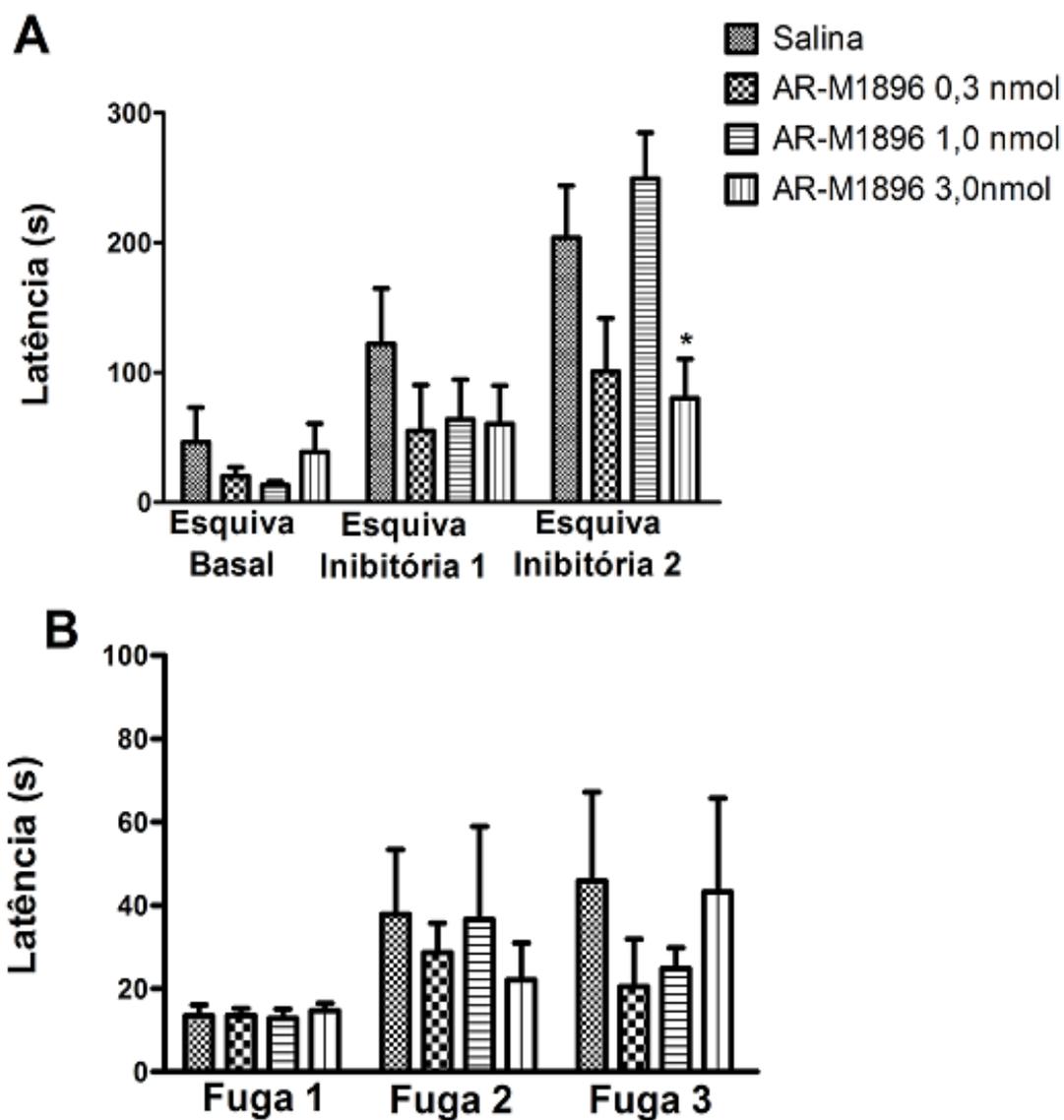


Figura 12 - Latência na Esquiva Inibitória (A) ou fuga (B) de ratos tratados com AR-M1896 nas doses de 0,3nmol (n=8) ou 1,0nmol (n=9) ou 3,0nmoles (n=13) ou salina (n=11) 20 minutos antes de serem submetidos ao LTE. Dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo salina na respectiva esquiva (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett)

Tabela 2. Distância percorrida no CA (em m) de ratos tratados com salina (n=11) ou AR-M1896 nas doses de 0,3nmoles (n=8) ou 1,0nmol (n=9) ou 3,0nmoles (n=13) no NDR 20 minutos antes de serem submetidos ao LTE e imediatamente após colocados no campo aberto.

| Tratamento | Distância Percorrida (m) * |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Salina (n=11) | 11,10 + 2,05 |
| AR-M1896 0,3nmol (n=8) | 18,99 + 5,46 |
| AR-M1896 1,0nmol (n=9) | 15,21 + 2,48 |
| AR-M1896 3,0nmol (n=13) | 18,65 + 2,38 |

*Dados representados como média \pm EPM

4.3 Experimento 3

Os resultados do pré-tratamento com o WAY100635, na dose de 0,18 nmol/0,2 μ L, sobre a injeção do agonista GALR2, AR-M1896, na dose de 3,0 nmoles/0,2 μ L no NDR são mostrados na figura 13. A ANOVA de medidas repetidas revelou que ocorreu aprendizado da esQUIVA inibitória durante o teste ($F_{(2,42)} = 30,77$; $p < 0,0001$) e mostrou um efeito estatisticamente significativo da interação tratamento x esQUIVA ($F_{(3,43)} = 3,06$; $p = 0,038$). Não foi observado efeito estatisticamente significativo do tratamento ($F_{(3,43)} = 2,60$; $p = 0,064$). A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento afetou a esQUIVA inibitória 2 ($F_{(3,43)} = 3,56$; $p = 0,022$), mas não a esQUIVA inibitória 1 ($F_{(3,43)} = 0,75$; $p = 0,526$).

A análise *post hoc*, empregando o Teste de Tukey, revelou que o AR-M1896 induziu efeito ansiolítico quando comparado com o controle salina/salina ($p=0,018$). O pré-tratamento com o WAY100635, per se, na dose de 0,18 nmol/0,2 μ L não alterou o comportamento dos animais ($p=0,823$ comparado com salina/salina). Mas foi capaz de atenuar o efeito ansiolítico do agonista GALR2 AR-M1896 na dose de 3,0nmoles, na esQUIVA inibitória 2, uma vez que não houve diferença entre o grupo salina/salina e WAY/AR-M1896 ($p=0,746$).

Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo salina/AR-M1896 e WAY/AR-M1896 ($p=0,117$).

Uma ANOVA de uma via revelou que o pré-tratamento com o WAY100635, sobre a injeção do AR-M1896 não afetou as três tentativas de fuga no LTE (Fuga 1: $F_{(3,43)} = 1,16$; $p = 0,335$; Fuga 2: $F_{(3,43)} = 1,38$; $p = 0,261$; Fuga 3: $F_{(3,43)} = 0,61$; $p = 0,615$).

A tabela 3 mostra que o pré-tratamento com o WAY100635 nos animais que receberam AR-M1896 na dose de 3,0 nmoles não alterou a atividade locomotora dos animais se comparado com os grupos controle ($F_{(3,38)} = 1,02$; $p = 0,394$).

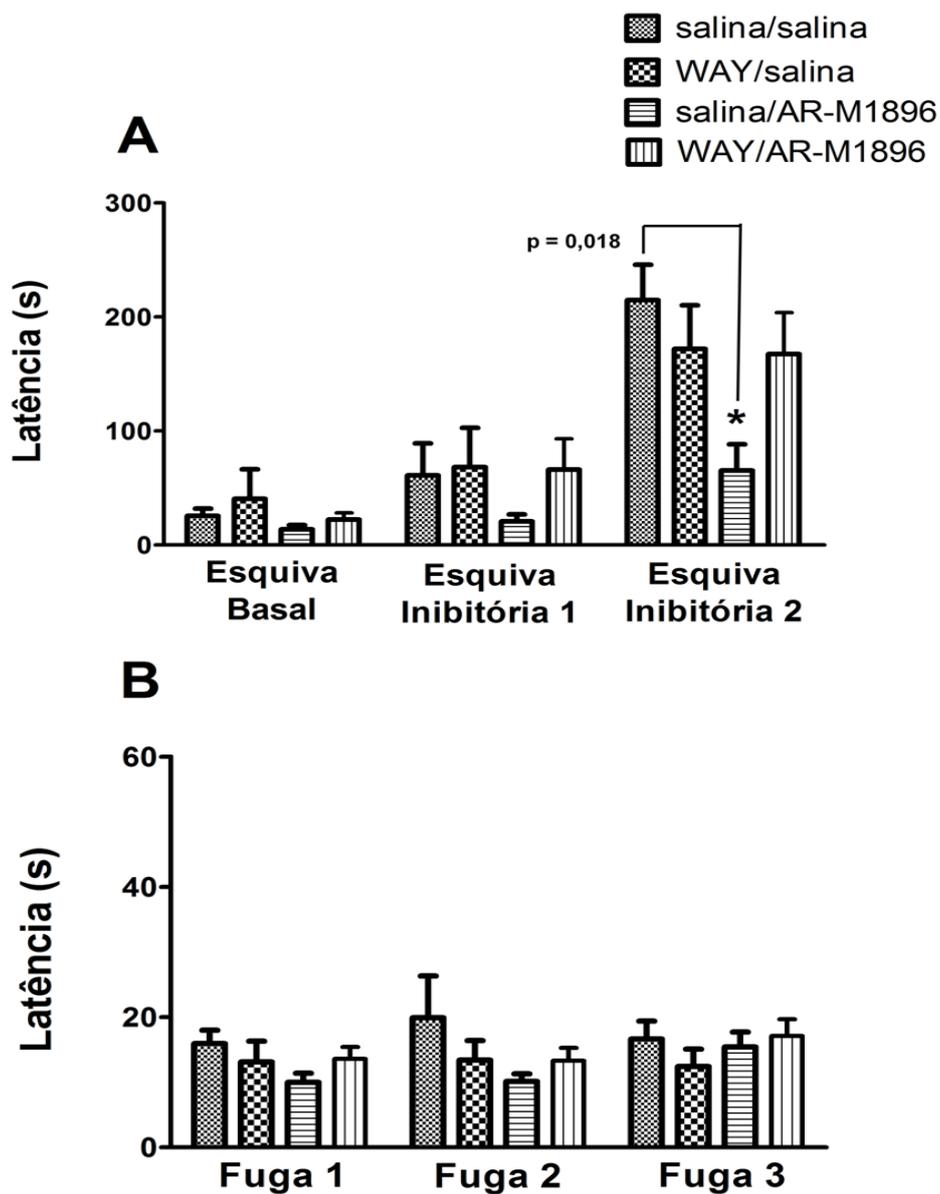


Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com WAY100635 sobre o efeito ansiolítico do AR-M1896 no NDR de ratos na latência da esquiva inibitória (A) ou fuga (B) no LTE. Grupos: salina/salina = 10; WAY 0,18nmoles/salina = 11; sal/AR-M1896 3,0nmoles = 12 e WAY 0,18nmoles/AR-M1896 3,0nmoles = 14. Dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo salina/AR-M1896 com o grupo salina/salina na respectiva esquiva (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey)

Tabela 3. Distância percorrida no CA (em m) de ratos tratados com salina/salina (n=10) ou salina/AR-M1896 3,0nmoles (n=12) ou WAY 0,18nmoles/AR-M1896 3,0nmoles (n=14) ou WAY 0,18nmoles/salina (n=11) no NDR e submetidos ao LTE e imediatamente após ao campo aberto.

| Tratamento | Distância Percorrida (m) * |
|------------------------|-----------------------------------|
| Salina/Salina (n=10) | 16,06 ± 2,81 |
| Salina/AR-M1896 (n=12) | 20,25 ± 3,10 |
| WAY/AR-M1896 (n=14) | 19,63 ± 3,11 |
| WAY/Salina (n=11) | 13,80 ± 1,65 |

*Dados representados como média ± EPM

4.4 Experimento 4

Os resultados da injeção da GAL no NDR na dose 0,3nmol/0,2 µL em animais submetidos à estimulação elétrica da MCPD são mostrados nas figuras 14 e 15. O teste de verossimilhança para coincidência revelou que o tratamento com a GAL na dose de 0,3nmol/0,2 µL elevou discretamente, mas significativamente os limiares de imobilidade ($\chi^2= 6,8$; 2 g.l.; $p= 0,033$), salto ($\chi^2= 9,7$; 2 g.l.; $p= 0,007$) e trote ($\chi^2= 14,1$; 2 g.l.; $p= 0,0009$) e não afetou os limiares de exoftalmia ($\chi^2= 4,4$; 2 g.l.; $p= 0,112$), e galope ($\chi^2= 3,9$; 1 g.l.; $p= 0,139$), induzidos pela estimulação elétrica quando comparado com os limiares da triagem. O procedimento de microinfusão de salina no NDR não alterou os limiares de salto ($\chi^2= 1,2$; 2 g.l.; $p= 0,548$), trote ($\chi^2= 0,08$; 2 g.l.; $p= 0,961$), exoftalmia ($\chi^2= 2,1$; 2 g.l.; $p= 0,349$), galope ($\chi^2= 3,4$; 2 g.l.; $p= 0,178$) e imobilidade ($\chi^2= 0,22$; 2 g.l.; $p= 0,895$) quando comparado com os limiares da triagem. O teste t para amostras independentes revelou que o tratamento com a GAL na dose de 0,3nmol/0,2 µL elevou significativamente os limiares de imobilidade ($p<0,0001$), salto ($p= 0,0012$) e trote ($p<0,0001$) e não afetou os limiares de exoftalmia ($p= 0,730$) e galope ($p=0,465$), induzidos pela estimulação elétrica quando comparado o grupo controle com aquele que recebeu a GAL. A diferença percentual, antes e após a microinfusão de GAL foi de 8,3% na imobilidade, 11,1% no salto e 12,8% no trote e nos animais tratados com salina foi de 0,2% na imobilidade, - 7,7% no salto e 1,3% no trote.

A diferença no número de animais em cada grupo se deve a alguns animais exibirem todas as reações de fuga e outros não. Assim, Δ imobilidade: sal (n = 13) e GAL (n=12), Δ exoftalmia: sal (n=13) e GAL (n =12), Δ trote: sal (n =11) e GAL (n=12), Δ galope: sal (n=4) e GAL (n=3), Δ salto: sal (n =8) e GAL (n=11).

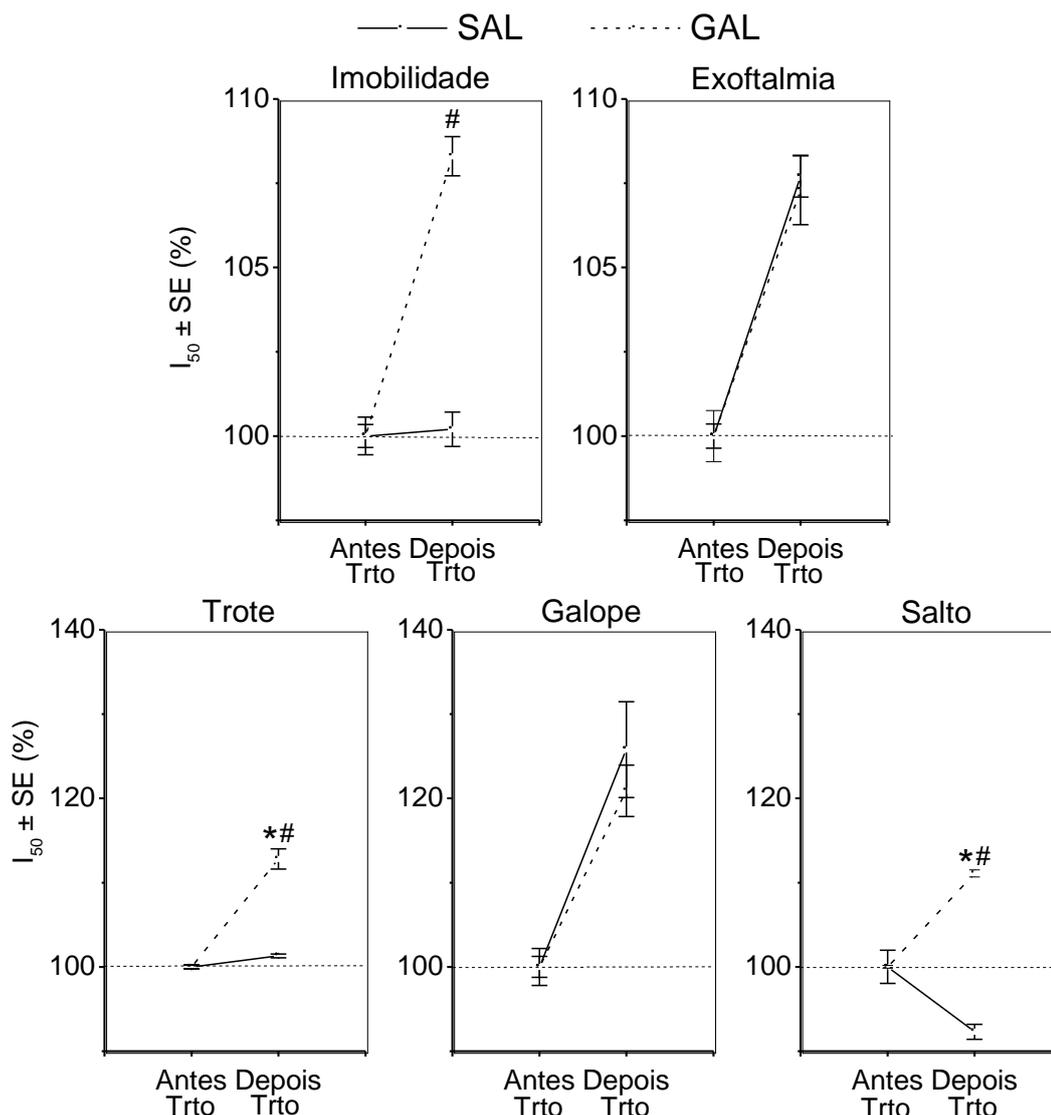


Figura 14 - Limiares de fuga induzidos pela estimulação elétrica da MCPD de ratos tratados com salina (n=13) e GAL 0,3nmol (n=12) intra-NDR. Dados representam a $I_{50} \pm EP$ (%). * $p < 0,05$ quando comparado antes e depois da administração de salina ou GAL (chi-quadrado (χ^2) para os ajustes logísticos significantes) e # $p < 0,05$ quando comparado o grupo salina com o grupo GAL (Teste t para amostras independentes).

5. DISCUSSÃO

O M617 intra-NDR foi capaz de alterar o comportamento dos animais no LTE. O agonista GALR1, nas doses de 1,0 e 3,0nmoles facilitou o comportamento de esquiva, ou seja, induziu efeito ansiogênico. Já o AR-M1896, agonista GALR2, na dose de 3,0 nmoles prejudicou o mesmo comportamento, efeito interpretado como ansiolítico. Esses resultados são contrários a nossa hipótese inicial. Além disso, não foi observado efeito panicogênico com o M617 e efeito panicolítico com o AR-M1896, uma vez que o tratamento com ambos os agonistas nas diferentes doses não afetou as três tentativas de fuga no LTE.

Os efeitos observados parecem não ser inespecíficos, uma vez que as doses administradas para ambos os agonistas não alteraram a distância total percorrida no campo aberto quando comparado com o grupo controle, ou seja, os efeitos observados se devem à administração do M617 e do AR-M1896 e não apenas a uma alteração na atividade locomotora dos animais.

Não podemos descartar a possibilidade de que o efeito do tipo ansiogênico com a administração do M617 possa ter sido observado devido a uma redução dos tempos de latência nas esquivas do grupo controle. Por outro lado, embora as latências desse grupo controle tenham sido menores do que nos outros experimentos, houve aprendizado da esquiva. Além disso, tivemos o cuidado de utilizar animais sempre mantidos nas mesmas condições ambientais e testar sempre os quatro grupos experimentais (salina e M617 nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0nmoles/0,2 μ L) em cada dia de experimento.

Outra possibilidade seria a perda da seletividade pelos subtipos de receptores de GAL. Entretanto, a constante de inibição, K_i , do M617 para GALR1 é de 0,23nM, enquanto para GALR2 é 5,7nM (LUNDSTROM *et al.*, 2005b). Dessa forma, é pouco provável que o M617, nas doses testadas, tenha ativado também o GALR2. A relação de afinidade GALR1/GALR2 inversa ocorre com o AR-M1896, que tem um K_i muito baixo para GALR2 comparado com aquele para GALR1. Embora o AR-M1896 também tenha afinidade por GALR3, ainda que menor que a afinidade por GALR2, a expressão de GALR3 é restrita apenas a regiões como o hipotálamo e amígdala (LIU *et al.*, 2001; LIU *et al.*,

2005; MAZARATI *et al.*, 2006; WATERS & KRAUSE, 2000; SMITH, 1998). Também foi verificada uma baixa expressão do receptor GALR3 no NDR (MENNICKEN *et al.*, 2002).

Alguns estudos apóiam a nossa idéia inicial de que a ativação de GALR1 induziria efeito tipo-ansiolítico e a ativação de GALR2 induziria efeito tipo-ansio gênico através da modulação serotoninérgica de neurônios partindo do NDR para estruturas límbicas, com conseqüente redução da concentração de 5-HT nestas estruturas. Por exemplo, um estudo de microdiálise demonstrou que a infusão i.c.v de GAL leva a uma redução da liberação de 5-HT no hipocampo ventral, no córtex pré-frontal medial e na amígdala central, o que estaria correlacionado com uma maior densidade de terminais e receptores galaninérgicos nestas estruturas (YOSHITAKE *et al.*, 2014). Mazarati e colaboradores (2005) também mostraram que a infusão de um agonista galaninérgico não-seletivo diretamente no NDR leva a uma redução da concentração de 5-HT nesta estrutura e no hipocampo. Já com a infusão de um agonista GALR2, também no NDR, observou-se uma elevação na concentração de 5-HT nas mesmas estruturas (MAZARATI *et al.*, 2005). Também a ativação de GALR1 pela GAL, no NDR, diminui a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos no NDR (PIERIBONE *et al.*, 1998).

Visto que os resultados obtidos nesse estudo são contrários a nossa hipótese inicial, a formação de complexos heterorreceptores GALR1/GALR2 poderia explicar nossos achados. Nesse sentido, foi observada a formação dos complexos de heterorreceptores GALR1/GALR2 em *in vitro* em células HEK293T transfectadas com os genes dos receptores de GAL e em *ex vivo* na formação hipocampal e nos núcleos dorsal e mediano da rafe. Além disso, o fragmento GAL(1-15) quando comparado com o fragmento GAL(1-29), ativou preferencialmente o protômero GALR1 e falhou em ativar GALR2, e ainda foi mais potente em inibir a atividade da sinalização via proteína Gi/0 e fator de transcrição CREB. A inibição de CREB pelos fragmentos foi completamente abolida pelo antagonista não-seletivo M35. Já o fragmento GAL (1-29) ativou preferencialmente GALR2 com marcado aumento da sinalização via proteína Gq/11 (BORROTO-ESCUELA *et al.*, 2014).

Mais um estudo abordou a existência dos complexos de heterorreceptores. Neste caso foi avaliado o efeito do fragmento N-terminal GAL (1-15) na ansiedade e depressão em ratos submetidos aos testes comportamentais do campo aberto, nado forçado, suspensão da cauda e teste de exploração claro/escuro. Todos os testes comportamentais revelaram um efeito do tipo depressivo e ansiogênico mais significativo do fragmento GAL (1-15), se comparado com a GAL. Além disso, a presença dos complexos de heterorreceptores foi analisada através de ensaio de proximidade de ligação entre os receptores. Este teste mostrou uma grande proximidade dos receptores GALR1 e GALR2 no NDR e no hipocampo dorsal, o que indica a formação dos complexos heterorreceptores. O envolvimento do receptor GALR2 com os efeitos do fragmento GAL (1-15) foi avaliado por meio do antagonista GALR2, M871 e por “knockdown” para o receptor GALR2, e o envolvimento do receptor GALR1 foi avaliado através de “knockdown” para o receptor GALR1. Neste caso, tanto o tratamento prévio com o antagonista M871 quanto o “knockdown” para GALR1 quanto para GALR2 foram capazes de bloquear os efeitos comportamentais observados com o fragmento GAL(1-15) administrado i.c.v.. Técnicas de imunohistoquímica revelaram a presença de receptores GALR1 e GALR2 em células da rafe, além dos aglomerados indicativos de complexos heterorreceptores, sendo, portanto essas células possíveis alvos para o fragmento GAL (1-15) (MILLÓN *et al.*, 2014).

Outro estudo revelou que concentrações nanomolares de GAL poderiam ativar heterorreceptores GALR1/5-HT_{1A} e levar a uma redução da afinidade de receptores 5-HT_{1A}, somatodendríticos, pela 5-HT (BORROTO-ESCUELA *et al.*, 2010).

Diante do exposto acima, uma hipótese para explicar os resultados obtidos no presente trabalho seria de que a formação de complexos heterorreceptores de GAL poderia estar interferindo na liberação de 5-HT em estruturas como amígdala e hipocampo, por exemplo. Assim, a ativação do receptor GALR1, o qual apresenta um mecanismo de transdução inibitório, levaria a uma redução da afinidade da 5-HT pelo receptor 5-HT_{1A} no NDR. Consequentemente, isso conduziria a um aumento da liberação de 5-HT em estruturas como amígdala e hipocampo, o que explicaria o efeito do tipo ansiogênico observado com a

administração do agonista GALR1, o M617. Ao contrário, a ativação do receptor GALR2 levaria a um aumento da afinidade da 5-HT pelo receptor 5-HT_{1A} no NDR. Isso levaria a uma redução da liberação de 5-HT em estruturas límbicas e explicaria o efeito do tipo ansiolítico observado com a administração do agonista GALR2, o AR-M1896 no teste do LTE.

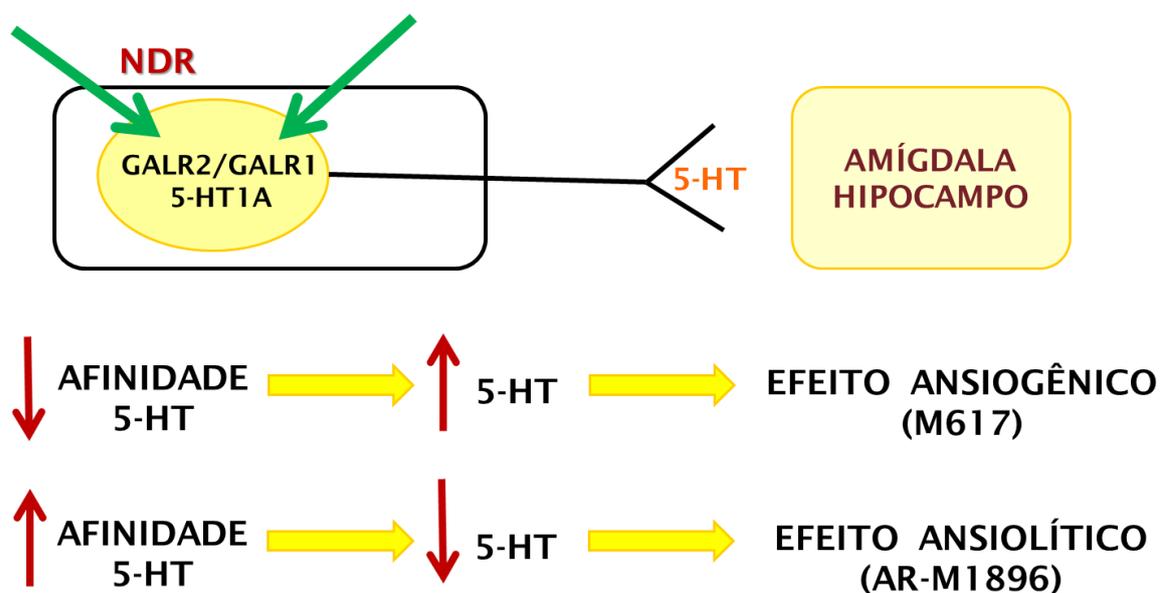


Figura 15 – Desenho esquemático sobre a hipótese da formação de complexos heterorreceptores GALR1/GALR2/5-HT_{1A}.

De fato, a administração i.c.v. de GAL reduziu a afinidade dos receptores 5-HT_{1A} no NDR (Razani et al, 2000). Entretanto, nesse estudo não foi identificado o receptor galaninérgico envolvido nesse efeito.

Um estudo anterior também mostrou uma interação molecular e funcional entre a GAL e o receptor 5-HT_{1A} (KEHR *et al.*, 2002). Eles observaram que a GAL em dose baixa, administrada i.c.v., 2 horas antes, atenuou a inibição da liberação de 5-HT no hipocampo induzida pela administração sistêmica de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT_{1A}. Eles também observaram que uma dose alta de GAL i.c.v. atenuou a hipotermia induzida pelo agonista 5-HT_{1A} (KEHR *et al.*, 2002).

Alguns estudos sugerem que a redução de 5-HT ou a falta de ativação de subtipos dos seus receptores no hipocampo ventral poderia estar mediando um efeito ansiolítico. Nesse sentido, a administração de um antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635, no hipocampo ventral, produz um efeito tipo-ansiolítico em camundongos expostos ao LCE, indicando um papel importante destes receptores na modulação da ansiedade em camundongos submetidos ao LCE (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2002).

Assim como mencionado anteriormente, para testar a hipótese de que os efeitos dos ligantes galaninérgicos na ansiedade mediada pelo NDR dependem da liberação de 5-HT e da ativação dos receptores 5-HT_{1A}, realizamos um experimento no qual foi administrado, intra-NDR, o antagonista 5-HT_{1A}, o WAY100635, para verificarmos se o mesmo seria capaz de bloquear o efeito ansiolítico do agonista GALR2, o AR-M1896 nos animais submetidos ao LTE. Nesse experimento, foi novamente observado o efeito ansiolítico do AR-M1896. Já a administração prévia do WAY100635, em uma dose que por si não induz efeito, foi capaz apenas de atenuar esse efeito ansiolítico do agonista GALR2, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo salina/AR-M1896 e WAY/AR-M1896. Isso fortalece a hipótese de que o efeito observado com o AR-M1896 se relaciona com a liberação de 5-HT e com a ativação de receptores 5-HT_{1A}. Vale ressaltar que a distância total percorrida pelos animais no campo aberto não foi alterada quando comparado com os grupos controle, ou seja, os efeitos observados parecem não ser inespecíficos, portanto, o efeito observado se deve à administração do AR-M1896 e não apenas a uma alteração na atividade locomotora dos animais.

Considerando que estudos iniciais em nosso laboratório observaram efeito ansiolítico da GAL injetada no NDR (SILOTE *et al.*, 2013), enquanto que no presente trabalho a ativação de GALR1 induziu efeito ansiogênico e a ativação de GALR2 induziu efeito ansiolítico no mesmo protocolo experimental, outra hipótese para conciliar tais resultados seria a possibilidade dos receptores para GAL ativados não estarem localizados em neurônios serotoninérgicos do NDR. De fato, foi identificada a presença de receptores GALR1, GALR2 (MELANDER *et al.*, 1988) e 5-HT_{1A} (KIRBY *et al.*, 2003) em interneurônios gabaérgicos, os quais poderiam exercer uma ação inibitória sobre projeções serotoninérgicas

partindo do NDR e chegando até o hipocampo ou amígdala, por exemplo. Dessa forma, a ativação de receptores GALR1, um subtipo de receptor que apresenta mecanismo de transdução inibitório, conduziria à inibição de interneurônios gabaérgicos, com consequente aumento da liberação de 5-HT em áreas como o hipocampo ou amígdala, o que poderia explicar o efeito tipo-ansiógênico observado com o M617. Da mesma forma, a ativação de receptores GALR2, um subtipo de receptor que apresenta mecanismo de transdução excitatório, conduziria à ativação de interneurônios gabaérgicos, com consequente redução da liberação de 5-HT, nas mesmas áreas citadas anteriormente, o que poderia explicar o efeito tipo-ansiolítico observado com o AR-M1896.

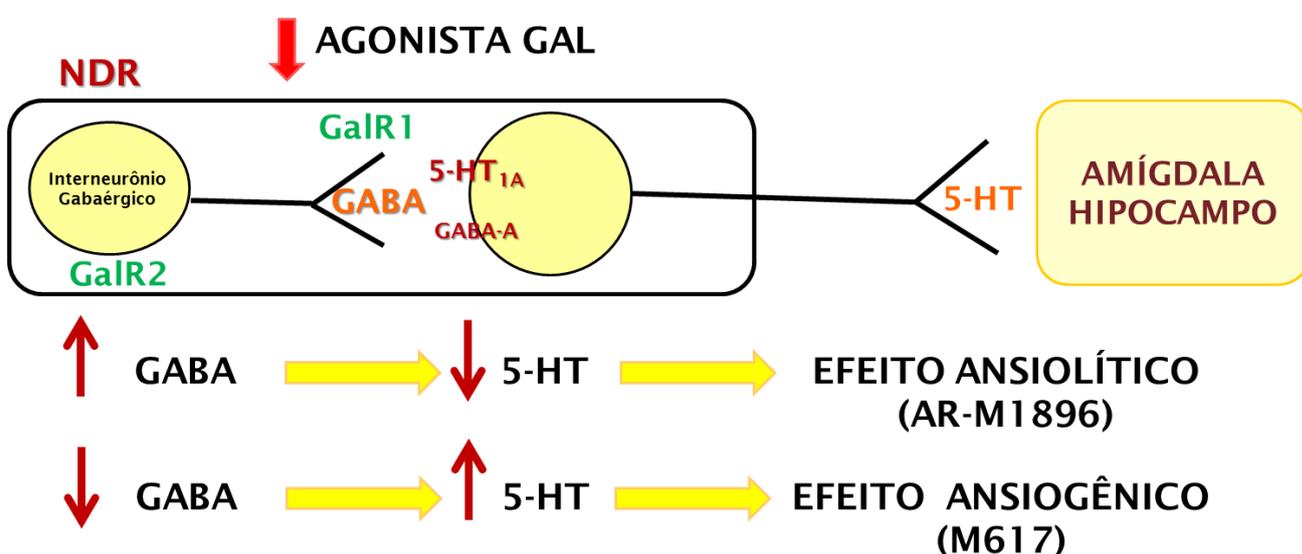


Figura 16 – Desenho esquemático sobre a hipótese da liberação de 5-HT via regulação da neurotransmissão gabaérgica por parte dos receptores GALR1 e GALR2.

Consistente com os resultados encontrados, um estudo avaliou o efeito de um agonista galaninérgico não-seletivo e um agonista preferencial GALR2 sobre as propriedades eletrofisiológicas e potenciais pós-sinápticos inibitórios (PPSI_S) gabaérgicos, em relação a neurônios serotoninérgicos no NDR (SHARKEY *et al.*, 2008). Nesse estudo, ambos os agonistas foram capazes de reduzir a amplitude dos PPSIs na maioria dos neurônios testados no NDR, sugerindo uma regulação da transmissão gabaérgica por parte de GALR1 e GALR2, sendo que o mecanismo pelo qual essa transmissão é alterada depende do

subtipo de receptor que está sendo ativado. Além disso, o agonista não-seletivo foi capaz de elevar a facilitação por pulso pareado (PPF), um fenômeno pré-sináptico, nos neurônios gabaérgicos do NDR (SHARKEY *et al.*, 2008). Assim, a GAL poderia estar agindo pré-sinápticamente, levando a uma redução da liberação de GABA e, conseqüentemente, a um aumento da liberação de 5-HT em estruturas límbicas responsáveis pelo efeito ansiogênico.

Também um estudo conduzido por Bajo e colaboradores (2012) sugeriu esta modulação do sistema gabaérgico por parte da GAL. Nesse estudo, foi avaliada a ação da GAL com a utilização de camundongos nocaute para os receptores GALR1 ou GALR2 ou nocautes para ambos e um antagonista GALR3, SNAP 37889. Além disso, foram avaliadas respostas à administração do etanol na neurotransmissão gabaérgica na amígdala central. A GAL apresentou um comportamento dual, ora aumentando, ora reduzindo o PPSI gabaérgico. Com a administração simultânea do etanol, o qual promove um aumento dos PPIs, observou-se uma potencialização na amplitude destes potenciais naqueles neurônios da amígdala central que já haviam apresentado um maior potencial. Já nos neurônios que apresentaram um menor potencial, a GAL atenuou o efeito do etanol sobre os PPIs (BAJO *et al.*, 2012).

Complementando os demais estudos, Rajarao e colaboradores (2007) também sugeriu a influência da GAL na neurotransmissão gabaérgica. Foi utilizado o Galnon, um agonista galaninérgico não-seletivo, para avaliar o papel da GAL na modulação da ansiedade e depressão, com o auxílio dos testes comportamentais, teste das quatro placas, labirinto em zero elevado, teste do nado forçado e teste de suspensão da cauda. Assim, tanto o Galnon, administrado intraperitonealmente, quanto a GAL, i.c.v, apresentaram um efeito ansiolítico de maneira dose dependente. Este efeito foi bloqueado pela administração central do M35, um antagonista galaninérgico não-seletivo. No caso específico do Galnon, a administração de um antagonista BZD, o flumazenil, reverteu os efeitos observados, sugerindo a participação da neurotransmissão gabaérgica. Consistente com estes achados, estudo de microdiálise *in vivo*, mostrou a elevação de GABA na amígdala, após o tratamento agudo com o Galnon. Contudo nem o Galnon, nem a GAL apresentaram efeito sobre a depressão (RAJARAO *et.al.*, 2007).

Dessa forma, é possível que o efeito ansiolítico da GAL (SILOTE et al, 2013), observado em dose baixa, seja devido à ativação principalmente de GALR2, que levaria a um aumento da liberação de GABA, e, conseqüentemente, redução da liberação de 5-HT em áreas como o hipocampo e amígdala. Essa hipótese precisará ser testada experimentalmente.

Por outro lado, os efeitos panicogênico e panicolítico esperados pela administração do M617 e do AR-M1896, respectivamente, não foram observados. Uma das limitações do modelo utilizado, ou seja, o LTE, é que a fuga (latência para deixar o braço aberto) normalmente ocorre em poucos segundos, de forma que detectar o efeito panicogênico (menor latência de fuga) pode ser difícil. Para tanto, o presente estudo propôs a utilização do modelo de estimulação elétrica da MCPD, um modelo experimental de pânico aparentemente mais sensível à detecção do efeito panicolítico/panicogênico (SCHENBERG *et al.*, 2001; BERTOGLIO *et al.*, 2007).

Conforme pode ser observado nos resultados, o tratamento com a GAL, na dose de 0,3nmol, aumentou os limiares de salto e trote induzidos na estimulação elétrica, ou seja, não foi observado o efeito panicogênico inicialmente esperado, mas um efeito panicolítico.

Em relação ao efeito da GAL no TP, um estudo sugeriu um possível papel da GAL na patogênese desse transtorno de ansiedade, uma vez que foi revelada uma relação entre os sintomas/severidade do TP em mulheres e variações no gene da GAL, com influência na fisiologia da ansiedade e depressão por uma ação estrógeno-dependente (UNSCHULD *et.al.*, 2008)

Estudo realizado por Spiacci e colaboradores (2012) revelou a marcação da proteína Fos, um marcador para avaliação da atividade neuronal, nas colunas dorsomedial e dorsolateral da MCP apenas em animais que foram submetidos à tarefa de fuga no LTE. Já nos animais submetidos à tarefa de esquivas inibitória no mesmo aparato, não foi observada marcação de neurônios positivos para Fos na mesma estrutura, para tanto este estudo sugere o recrutamento da MCP no pânico. Além disso, eles observaram, através de co-localização Fos e triptofano-hidroxilase, a ativação de neurônios não

serotoninérgicos nas “asas laterais” do NDR e na coluna ventrolateral da MCP em animais expostos à tarefa de fuga do LTE, relacionada com o pânico. Por outro lado, eles descreveram a ativação de neurônios serotoninérgicos nas porções médio-caudal e caudal do NDR em animais submetidos à tarefa de esquiva, relacionada à ansiedade. Este estudo não foi conclusivo quanto à identificação neuroquímica dos neurônios não-serotoninérgicos ativados em resposta à fuga. (SPIACCI *et al.*, 2012). Porém, estudo imunohistoquímico, conduzido por Calizo e colaboradores (2011), revelou que as “asas laterais” do NDR e a coluna ventrolateral da MCP são regiões ricas em neurônios gabaérgicos (CALIZO *et al.*, 2011). Nesse sentido, uma explicação para os resultados obtidos seria de que a GAL, intra-NDR poderia ter ativado seus receptores, provavelmente GALR1 pré-sináptico, nos interneurônios gabaérgicos, reduzindo a liberação de GABA e, conseqüentemente, seu efeito inibitório sobre os neurônios serotoninérgicos. Assim, a ativação de GALR1, pela GAL, levaria indiretamente a um aumento da liberação de 5-HT na MCP, o que conduziria ao efeito panicolítico observado.

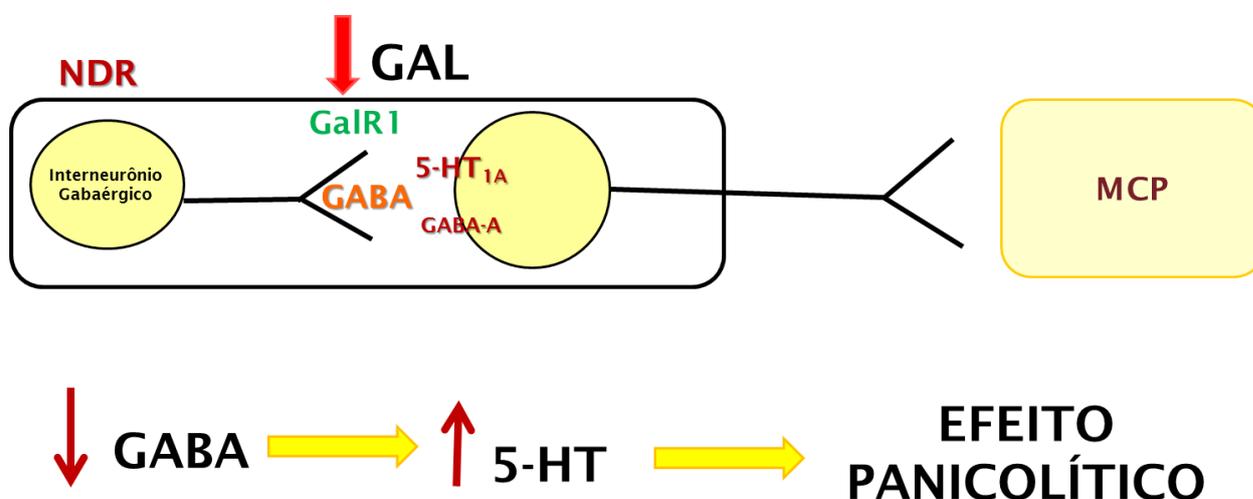


Figura 17 – Desenho esquemático sobre a hipótese da ativação de receptores GALR1 pré-sinápticos nos interneurônios gabaérgicos.

Estudo empregando a administração de um marcador fluorescente na MCP investigou a marcação retrógrada no NDR. A fluorescência foi visualizada principalmente nas “asas laterais” e na porção dorsal do NDR de forma ipsilateral (STEZHKA & LOVICK, 1997).

Com o intuito de garantir a difusão da GAL para todos os grupos de neurônios do NDR, no presente trabalho a inserção da cânula foi direcionada para a porção central do NDR. Porém, a estimulação elétrica foi realizada contralateralmente na MCPD, ou seja, é possível que a GAL injetada no NDR não tenha afetado amplamente os neurônios das “asas laterais” desse núcleo, de forma que as alterações as reações de fuga induzidas pela estimulação elétrica da MCPD não foram tão marcantes. O ideal seria que a inserção da cânula e do eletrodo fosse realizada no mesmo hemisfério cerebral, porém tecnicamente isso seria inviável.

Outra limitação do presente estudo foi a administração de apenas uma dose da GAL, o que pode ter impedido a observação do efeito panicogênico esperado em doses mais altas.

Por outro lado, estudos anteriores em nosso laboratório também revelaram que a GAL, administrada intra-MCPD, prejudicou a tarefa de esquiva, mas não a fuga no LTE (SOARES *et al.*, 2014), sugerindo a participação deste neuropeptídeo principalmente no TAG.

Assim, nossos resultados mostram que a injeção do agonista GALR1, o M617, no NDR facilitou a esquiva inibitória, nas doses de 1,0 e 3,0nmoles, em animais submetidos ao LTE, sugerindo um efeito ansiogênico. Já a injeção do agonista GALR2, o AR-M1896, no NDR prejudicou a esquiva inibitória, na dose de 3,0nmoles, em animais submetidos ao LTE, sugerindo um efeito ansiolítico. Contudo o tratamento com ambos os ligantes não alterou a tarefa de fuga no LTE e a atividade locomotora dos animais no campo aberto.

O pré-tratamento com o WAY100635, na dose de 0,18nmol nos animais que receberam o agonista GALR2 intra-NDR atenuou o efeito ansiolítico inicialmente observado.

E por fim, o tratamento com GAL, na dose de 0,3nmol, aumentou os limiares de fuga, induzidos pela estimulação elétrica da MCPD, induzindo efeito panicolítico.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, este trabalho fortalece outros estudos relativos à participação desse neuropeptídeo na modulação da ansiedade pelo NDR e reforçam a relação entre os receptores galaninérgicos e a liberação de 5-HT, assim como a ativação de receptores 5-HT_{1A}. Os resultados mostram, ainda, que o efeito da GAL nos transtornos de ansiedade nesse subnúcleo depende do subtipo de receptor galaninérgico ativado. Como os agonistas galaninérgicos não foram capazes de modificar a fuga do LTE e o aumento dos limiares de fuga dos animais submetidos à estimulação elétrica da MCPD foi discreto, sugere-se a participação deste neuropeptídeo no TP, mas principalmente no TAG.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABRAMS, J. K.;JOHNSON, P.L.;HOLLIS, J.H.; LOWRY, C.A. Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 44, p. 46–57, 2004.

ANDRADE,L.H.; WANG, Y.P.; ANDREONI, S.;SILVEIRA C.M.; ALEXANDRINO-SILVA, C.; Mental Disorders in Megacities: Findingsfromthe São Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil **PLoS ONE**. v.7, n.2, p.1-11, 2012

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

BAILEY,K.R.; PAVLOVA, M.N. ;ROHDE, A.D. ; HOHMANN, J.G.;CRAWLEY, J.N.; Galanin receptor subtype2 (GALR2) null mutant mice display an anxiogenic-like phenotype specific to the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.86, p. 8-20, 2007.

BAJO, M.; MADAMBA, S.G.; LU, X.; SHARKEY, L.M.; BARTFAI, T.; SIGGINS, G.R.; Receptor subtype-dependent galanin actions on gamma-aminobutyric acidergic neurotransmission and ethanol responses in the central amygdala. **Addiction biology**, v. 17, n. 4, p. 694–705, 2012.

BARTFAI, T.;LANGEL, U.;BEDECS, K.;ANDELL, S.;LAND, T.;GREGERSEN, S.;AHREN, B.;GIROTTI, P.;CONSOLO, S.;CORWIN, R.;CRAWLEY, J.;XU, X.;WIESENFELD-HALLIN, Z.;HOKFELT, T.; Galanin-receptor ligand M40 peptide distinguishes between putative galanin-receptorsubtypes. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v.90, p.11287-11291,1993.

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

BARTFAI, R.; BEDECS, K.; LAND, T.; LANGEL, U.; BERTORELLI, R.; GIROTTI, P.; CONSOLO, S.; XU, X.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; NILSSON, S.; 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.

BEDECS, K.; LANGEL, U.;BARTFAI, T.; Metabolism of Galanin and Galanin (1-16) in Isolated Cerebrospinal Fluid and Spinal Cord Membranes from Rat. **Neuropeptides**, v.29, p. 137-143, 1995.

BERTOGLIO, L.J.; DE BORTOLI, V.C.; ZANGROSSI JUNIOR, H. Cholecystokinin-2 receptors modulate freezing and escape behaviors evoked by the electrical stimulation of the rat dorsolateral periaqueductal Gray. **Brain Research**, v.1156, p.133-138, 2007

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. AND 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.

BITTENCOURT, A.S.; NAKAMURA-PALACIOS, M.; MAUAD, H.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L.C.; Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 873–92, 2005.

BOROWSKY, B.; WALKER, M.W.; HUANG, LY.; JONES, K.A.; SMITH, K.E.; BARD, J.; BRANCHEK, T.A.; GERALD, C. Cloning and characterization of the human galanin GALR2 receptor. **Peptides**, v. 19, n. 10, p. 1771–1781, 1998.

BORROTO-ESCUELA, D. O.; NARVAEZ, M.; MARCELLINO, D.; PARRADO, C.; NARVAEZ, J.A.; TARAKANOV, A.O.; AGNATI, L.F.; DÍAZ-CABIALE, Z.; FUXE, K.; Galanin receptor-1 modulates 5-hydroxytryptamine-1A signaling via heterodimerization. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 393, n. 4, p. 767–72, 2010.

BORROTO-ESCUELA, D. O.; NARVAEZ, M.; DI PALMA, M.; CALVO, F.; RODRIGUEZ, D.; MILLON, C.; CARLSSON, J.; AGNATI, L.F.; GARRIGA, P.; DÍAZ-CABIALE, Z.; FUXE, K. Preferential activation by galanin 1-15 fragment of the GALR1 protomer of a GALR1-GALR2 heteroreceptor complex. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 452, n. 3, p. 347–53, 2014.

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.; KOFLER, B. GAL 3 receptor KO mice exhibit an anxiety- like phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 19, p. 1–6, 2014.

CALIZO, L. H.; AKANWA, A.; MA, X.; PAN, Y.; LEMOS, J.C.; CRAIGE, C.; HEEMSTRA, L.A.; BECK, S.G. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 524–43, 2011.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M.V.;AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S.; Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brasil)** v. 35 Suppl 2, p. 101–111, 2013.

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. 1129–61, 2011.

DE PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI, H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain research bulletin**, v. 64, n. 2, p. 181–8, 2004.

DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; Reversible inactivation of the dorsal raphe nucleus blocked the antipanic-like effect of chronic imipramine in the elevated T-maze. **Neuroscience Letters.**, v. 407, n. 1, p. 80-5, 2006.

DOS SANTOS, L.; DE ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI JUNIOR, H. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 4, p. 286–94, 2008.

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

ELLIOTT-HUNT, C. R; MARSH, B.; BACON, A.; POPE, R.; VANDERPLANK, P.; WYNICK, D.; Galanin acts as a neuroprotective factor to the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 101, n. 14, p. 5105-5110, 2004.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative Study of Pre- and Postsynaptic 5-HT 1A Receptor Modulation of Anxiety in Two Ethological Animal Tests. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 15, p. 4810–4815, 1996.

FLORÈN, A.; SOLLENBERG, U.;LUNDSTROM,L.; ZORKO ,M.; STOJAN, J.;BUDIHNA ,M.; WHEATLEY ,M.; MARTIN ,N.P.;KILK ,K.; MAZARATI, A.;BARTFAI ,T.; LINDGREN ,M.;LANGEL, U.;Multiple interaction sites of galanin trigger its biological effects. **Neuropeptides**, v.39, P.547–558, 2005

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, p. 67-70, 1993.

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

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

GRAEFF, F. G. Serotonina , matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria (São Paulo, Brasil)**, v. 25, n. Supl II, 2003.

GRAEFF, F.G.; Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista Brasileira de Psiquiatria (São Paulo, Brasil)** v.29, p.3-6, 2007.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Medicamentos antiansiedade. In: **Fundamentos da Psicofarmacologia**. São Paulo. Edit. Atheneu, 2012.

GUSTAFSON, E.L.;SMITH, K.E.;DURKIN, M.M.;GERALD, C.; BRANCHEK, T.A.; Distribution of a rat galanin receptor mRNA in rat brain. **Neuroreport**.v.7, p. 953-7, 1996

HABERT-ORTOLI, E.;, AMIRANOFF,B.; LOQUET,I.;LABURTHE,M.; MAYAUX,J.F.; Molecular cloning of a functional human galanin receptor. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v.91, p.9780-9783, 1994

HALL, C. S. Temperament : A survey of animal studies. **Psychological Bulletin**. v. 38, n. 10, p. 909–943, 1941.

HAMMACK, S. E.; RICHEY, K.J.;SCHMID, M.J.; LOPRESTI, M.L.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. The Role of Corticotropin-Releasing Hormone in the Dorsal Raphe Nucleus in Mediating the Behavioral Consequences of Uncontrollable Stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 1020–1026, 2002.

HÖKFELT, T.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; VILLAR, M.; MELANDER, T.; Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. **Neuroscience Letters**, v.83, p.217-220,1987

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

HOLMES, A.;KINNEY, J.W.; WRENN, C.C.; LI, Q.; YANG, R.J.; MA, L.; VISHWANATH, J.; SAAVEDRA, M.C.; INNERFIELD, C.E.; JACOBY, A.S.; SHINE, J.; LISMAA, T.P.; CRAWLEY, J.N.; Galanin GALR1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1031-1044, 2003.

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

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. 11, p. 580–8, nov. 2003.

JACOBY, A. S.; HORT, Y.J.; CONSTANTINESCU, G.; SHINE, J.; IISMAA, T.P.; Critical role for GALR1 galanin receptor in galanin regulation of neuroendocrine function and seizure activity. **Molecular Brain Research**, v. 107, n. 2, p. 195–200, 15 nov. 2002.

JIMENEZ-ANDRADE, J.M.; LUNDSTRÖM, L.; SOLLENBERG, U.E.; LANGEL, U.; CASTAÑEDA-HERNANDEZ, G.; CARLTON, S.M.; Activation of peripheral galanin receptors: Differential effects on nociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 273–280, 2006.

JOHANSSON, L.; SOHN, D.; THORBERG, SO.; JACKSON, D.M.; KELDER, D.; LARSSON, LG.; RÉNYI, L.; ROSS, S.B.; WALLSTEN, C.; ERIKSSON, H.; HU, PS.; JERNING, E.; MOHELL, N.; WESTLIND-DANIELSSON, A. The Pharmacological Characterization of a Novel Selective 5-Hydroxytryptamine 1A Receptor Antagonist, NAD-299. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 1, p. 216–225, 1997.

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 USA**. p.1666-1673, 2014.

KAKUYAMA, H.; KUWAHARA, A.; MOCHIZUKI, T.; HOSHINO, M.; YANAIHARA, N.; Role of N-terminal active sites of galanin in neurally evoked circular muscle contractions in the guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v.329, p. 85–91, 1997.

KASK, K.; BERTHOLD, M.; BOURNE, J.; ANDELL, S.; LANGEL, U.; BARTFAI, T.; Binding and agonist / antagonist actions of M35 in Rin m 5F insulinoma cells. **Regulatory Peptides**, v. 59, p. 341–348, 1995.

KEHR, J.; YOSHITAKE, T.; WANG, FH.; RAZANI, H.; GIMENEZ-LLORT, L.; JANSSON, A.; YAMAGUCHI, M.; OGREN, S.O. Galanin is a potent in vivo modulator of mesencephalic serotonergic neurotransmission. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, 2002.

KHOSHBOUEI, H.; CECCHI, M.; DOVE, 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.401-417, 2002.

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.

KINNEY, J.W.; STAROSTA, G.; HOLMES, A.; WRENN, C.C.; YANG, R.J.; HARRIS, A.P.; LONG, K.C.; CRAWLEY, J.; Deficits in Trace Cued Fear Conditioning in Galanin-Treated Rats and Galanin-Overexpressing Transgenic Mice **Journal Learning & Memory**, v.9, p.178-90, 2002.

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, p.3489-3500, 1998

KIRBY, L.G.; PERNAR, L.; VALENTINO, R.J.; BECK, S.G.; Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. **Neuroscience** v.3, p. 669–83, 2003.

KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. v. 13, p. 423–437, 2011.

KOLAKOWSKI, L. F.; O'NEILL, G.P.; HOWARD, A.D.; BROUSSARD, S.R.; SULLIVAN, K.A.; FEIGNER, S.D.; SAWZDARGO, M.; NGUYEN, T.; KARGMAN, S.; SHIAO, LL.; HRENIUK, D.L.; TAN, C.P.; EVANS, J.; ABRAMOVITZ, M.; CHATEAUNEUF, A.; COULOMBE, N.; NG, G.; JONHSON, M.P.; THARIAN, A.; KHOSHBOUEI, H.; GEORGE, S.R.; SMITH, I.G.; O'DOW, B.F.; Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. **Journal of neurochemistry**, v. 71, n. 6, p. 2239–51, dez. 1998.

LAND, T.; LANGEL, U.; BARTFAI, T.; Hypothalamic degradation of galanin(1-29) and galanin(1-16): identification and characterization of the peptidolytic products. **Brain Research**, v.558, p.245-250, 1991

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.

LIU, S.; HU, H.Z.; GAO, C.; GAO, N.; XIA, Y.; WOOD, J.D.; Actions of galanin on neurotransmission in the submucous plexus of guinea pig small intestine. **European Journal of Pharmacology**, v.471, p. 49– 58, 2003.

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

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

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.

LYUDYNO, V.I.; ABDURASULOVA, I.N.; KLIMENKO, V.M.; The role of neuropeptide galanin in forming type-specific behavioral characteristics. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v.38, p. 93-98, 2006.

MAZARATI, A.; LANGEL, U.; BARTFAI, T.; Galanin: an endogenous anticonvulsant? **The neuroscientist**, v. 7, n. 6, p. 506-517, 2001.

MAZARATI, A.; 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. **The 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, AC.; OERTEL, WH.; 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.

MELANDER, T.; KOHLER, C.; NILSSON, S.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; THEODORSSON, E.; BARTFAI, T.; Autoradiographic quantitation and anatomical mapping of ¹²⁵I-galanin binding sites in the rat central nervous system. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.1(4), p. 213–33, 1988.

MENNICKEN, F.; HOFFERT, C.; PELLETIER, M.; AHMAD, S.; O'DONNELL, D. Restricted distribution of galanin receptor 3 (GalR3) mRNA in the adult rat central nervous system. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 24, p. 257-268, 2002.

MIGUEL, T.L.B.; POBBE, R.L.H.; SPIACCI, A.Jr.; ZANGROSSI JUNIOR, H.; Dorsal raphe nucleus regulation of a panic-like defensive behavior evoked by chemical stimulation of the rat dorsal periaqueductal gray matter. **Behavioural Brain Research**, v. 213, p. 195–200, 2010.

MILLON, C.; BURGESS-FLORES, A.; NARVAEZ, M.; BORROTO-ESCUELA, D.; PARRADO, C.; NARVAEZ, J.; FUXE, K.; DÍAZ-CABIALE, Z. A role for galanin N-terminal fragment (1-15) in anxiety and depression-related behaviours in rats. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, 2014

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.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain research**, v. 927, n. 1, p. 87–96, 8 fev. 2002.

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.

OGREN, S.O.; HOKFELT, T.; KASK, K.; LANGEL, U.; BARTFAI, T.; Evidence for a role of the neuropeptide galanin in spatial learning. **Neuroscience**, v. 51, p. 1–5, 1992.

PARKER, E. M.; IZZARELLI, D.G.; NOWAK, H.P.; MAHLE, C.D.; IBEN, L.G.; WANG, J.; GLODSTEIN, M.E. Cloning and characterization of the rat GALR1 galanin receptor from Rin14B insulinoma cells. **Molecular Brain Research**. v. 34, p. 179–189, 1995.

PAUL, E. D.; LOWRY, C. A. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 12, p. 1090–106, 2013.

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

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185–192, 2003.

PRIESTLEY, J.V.; WOTHERSPOON, G.; SAVERY, D.; AVERILL, S.; RATTRAY, M.; A combined in situ hybridization and immunofluorescence procedure allowing visualisation of peptide mRNA and serotonin in single sections. **Journal of Neuroscience Methods**. v.48, p.99-110, 1993

RAJARAO, S.J.; 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.

RAZANI, H.; CABIALE-DIAZ, Z.; FUXE, K.; OGREN, S.O. Intraventricular galanin produces a time-dependent modulation of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe of the rat. **Neuroreport**. v. 11, p. 3943-3948, 2000

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.; VARGAS, L.C.; Modeling panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n.7-8, p. 647-59, 2001.

SAAR, I.; RUNESSON, J.; MCNAMARA, I.; JARV, J.; ROBINSON, J.K.; LANGEL, U.; Novel galanin receptor subtype specific ligands in feeding regulation. **Neurochemistry international**, v. 58, n. 6, p. 714–20, 2011.

SENA, L.M.; BUENO, C.; Pöbbe, R.L.; ANDRADE, T.G.; ZANGROSSI JUNIOR, H.; VIANA, M.B.; The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behavioural Brain Res.**, v.142, n. 1-2, p. 125-33, 2003.

SHARKEY, L.M.; MADAMBA, S.G.; SIGGINS, G.R.; BARTFAI, T.; Galanin alters GABAergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus. **Neurochemical Research**, v.33, p.285-291, 2008

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, K. E; WALKER, M.W.; ARTYMYSHYN, R.; BARD, J.; BOROWSKY, B.; TAMM, J.A.; YAO, W.J.; VAYSSE, P.JJ.; BRANCHEK, T.A.; GERALD, C.; JONES, K.A.; Cloned Human and Rat Galanin GALR3 Receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 36, p. 23321–23326, 1998.

SOARES, Flávia Roberta Chaves. **O papel da galanina na modulação da ansiedade experimental mediada pela matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos**. 2014.67f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória 2014

SPIACCI, A.JR.; ; COIMBRA, N. C.; ZANGROSSI JUNIOR, 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.

STEZHKA, V. .; LOVICK, T. . Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 230, n. 1, p. 57–60,1997.

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

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

UNSCHULD, P.G.; ISING, M.; ROESKE, D.; ERHARDT, A.; SPECHT, M.; KLOIBER, S.; UHR, M.; MÜLLER-MYHSOK, B.; HOLLSBOER, F.; BINDER, EB.; Gender-specific association of galanin polymorphisms with HPA-axis dysregulation, symptom severity, and antidepressant treatment response. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 7, p. 1583-92, 2010.

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.; HOLLSBOER, 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. 177-84, 2008.

VARGAS, L. C.; SCHENBERG, L. C. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive behaviors of the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, p. 260–268, 2001.

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

VIANA, M. B.; GRAEFF, F. G.; LÖSCHMANN, P. A. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 58, n. 1, p. 167–72,1997.

XU, Z.Q.;ZHANG, X.;PIERIBONE, V.A.;GRILLNER, S.;HÖKFELT, 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.

YOSHITAKE, S.; KUTEEVA, E.; HOKFELT, T.; MENNICKEN, F.; THEODORSSON, E.; YAMAGUCHI, M.; KEHR, J.; YOSHITAKE, T.; Correlation between the effects of local and intracerebroventricular infusions of galanin on 5-HT release studied by microdialysis, and distribution of galanin and galanin receptors in prefrontal cortex, ventral hippocampus, amygdala, hypothalamus, and striatum of awake rats. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 68, n. 5, p. 179–93, 2014.

WANG, S.; GUSTAFSON, E.L.; Galanin Receptor Subtypes. **Drug News Perspect.** v. 11, p. 458-468, 1998

WATERS, S.M. and KRAUSE, J.E.; Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. **Neuroscience**.v.95, n.1, p. 265–271, 2000.

WEBLING, E.B.;RUNESSON, J.;BARTFAI, T.;LANGEL, U.;Galanin receptors and ligands. **Frontiers in Endocrinology**, v3, p. 1-14, 2012.

WIESENFELD-HALLIN, Z.; XU, X.J.; LANGEL, U.; BEDECS, K.; HOKFELT, T.; BARTFAI, T.; Galanin-mediated control of pain: enhanced role after nerve injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 8, p. 3334–7,1992.

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

ZANGROSSI JUNIOR, H.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 637-45, 2001.

ZANGROSSI JUNIOR, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2014.

ZHAO, X.; SEESE, R.R.; YUN, K.; PENG, T.; WANG, Z.; The role of galanin system in modulating depression, anxiety, and addiction-like behaviors after chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 246, p. 82–93, 2013.

ZINI, S.; ROISIN, MP.; 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.