

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

Envolvimento de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} da
substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de
respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico

Paula Shimene de Melo Yamashita

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

Envolvimento de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} da substância
cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de respostas
defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico

Paula Shimene de Melo Yamashita

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior

Ribeirão Preto

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada para a Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

YAMASHITA, Paula Shimene de Melo

Envolvimento de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico. Ribeirão Preto, 2010.

77 p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Serotonina. 2. Substância cinzenta periaquedutal dorsal. 3. Ansiedade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Shimene de Melo Yamashita

Envolvimento de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} da substância
cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de respostas
defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: FCF – UNESP

Assinatura: _____

Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.

São Francisco de Assis

À minha amiga, companheira, e muito querida mãe, por seu incondicional amor e apoio, pela sua incondicional confiança e tolerância, por despertar em mim desde o início de minha existência o incansável desejo de ser melhor a cada dia...

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pelo dom da vida, pelo amor e pela misericórdia, pelo sopro de seu Santo Espírito que me ilumina e me guia a cada dia, que me ajuda a ser melhor e me dá forças para superar cada dificuldade mostrando-me que sou capaz de vencer os desafios diários e alcançar os meus anseios ...

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr., que confiou em meu trabalho e em minha competência. Agradeço pela orientação, pela confiança, pela paciência e pelos ensinamentos.

Agradeço a toda a minha família, pela confiança e pelo apoio, especialmente aos meus pais, meu “irmãozinho”, ao saudoso Chiquinho e ao travesso Billy, que fizeram e fazem parte da minha vida, contribuindo de forma muito especial, estando ao meu lado e me dando muito carinho principalmente nas horas mais difíceis...

Aos queridos amigos de Campo Grande, dos quais sinto tanta saudade, que depositaram em mim muita confiança e mesmo à distância permaneceram ao meu lado, torcendo sempre por mim...

Aos novos amigos de Ribeirão Preto e aos irmãos da OFS Santa Clara, que me acolheram, me aceitaram como sou e tanto me ensinaram, proporcionando a sensação que aqui também já é minha casa.

Aos colegas do laboratório, pela paciência, compreensão, ensinamentos, colaboração e amizade. Agradeço de maneira especial ao Afonso, pela excelente assistência técnica diária, pela amizade, preocupação, compreensão e por tornar a convivência diária mais agradável e divertida.

Aos funcionários da CPG da FMRP, aos docentes e funcionários do departamento de Farmacologia, em especial à Soninha, Fátima, Ramón, Inês e Eliana, pela colaboração, compreensão, assistência e prestatividade.

Aos professores Dr. Frederico Guilherme Graeff e Dr. Ricardo Nunes de Souza, pela atenção, disponibilidade e contribuição para este trabalho.

Ao CNPq e FAEPA, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Evidências experimentais indicam que a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) participa de processos emocionais como ansiedade e medo. A estimulação elétrica ou química desta estrutura promove mudanças comportamentais e alterações fisiológicas, sugerindo que o animal experimental esteja passando por uma experiência aversiva. A resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD tem sido utilizada como um modelo animal para o estudo de ataques de pânico em humanos. Utilizando esse modelo experimental, tem sido demonstrado que a serotonina (5-HT) desempenha papel inibitório na regulação do comportamento de fuga, sugerindo um efeito do tipo panicolítico. A ativação de receptores serotoninérgicos da SCPD também inibe a resposta de fuga gerada em outro modelo experimental que relaciona esta resposta defensiva ao pânico, o labirinto em T elevado (LTE). Além da resposta de fuga, esse modelo é capaz de gerar, em um mesmo animal, a resposta de esquiva inibitória que está relacionada com o transtorno de ansiedade generalizada. Estudos prévios no LTE indicam que a injeção intra-SCPD de 5-HT desencadeia efeitos ansiogênico e panicolítico. Evidências indiretas sugerem que o efeito ansiogênico da 5-HT é mediado por receptores dos tipos 5-HT_{2C}, enquanto que o efeito panicolítico parece ser modulado por receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Neste trabalho procuramos estender as investigações acerca do papel dos receptores 5-HT_{2C} da SCPD na regulação de respostas de defesa associadas à ansiedade e ao pânico, medidas no LTE. Para tal, observamos os efeitos da microinjeção na SCPD dos agonistas preferenciais de receptores 5-HT_{2C}, MK-212 e RO-600175, e do antagonista seletivo desses receptores, SB-242084. Os resultados mostraram que os agonistas MK-212 e RO-600175 facilitaram a aquisição de esquiva inibitória, sugerindo efeito ansiogênico, sem afetar a resposta de fuga. Além disso, a microinjeção prévia de SB-242084 preveniu o efeito ansiogênico gerado pelo MK-212. Em relação à participação dos receptores 5-HT_{2C} da SCPD nas respostas associadas ao pânico, verificamos que o agonista MK-212 também não alterou a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD. Assim, nossos resultados sugerem que o efeito ansiogênico da 5-HT sobre a resposta de esquiva inibitória é mediado por receptores do tipo 5-HT_{2C}. Por outro lado, a ativação desses receptores, embora promova efeito do tipo ansiogênico, não altera a resposta de fuga, indicando que esses receptores estão envolvidos na regulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade, mas não ao pânico.

ABSTRACT

Experimental evidence indicates that the dorsal periaqueductal gray (dPAG) participates in emotional processes such as fear and anxiety. Electrical or chemical stimulation of this brain structure promotes behavioral changes and physiological alterations indicative of an aversive experience. The escape response induced by the stimulation of the dPAG has been used as an animal model for the study of panic attacks in humans. Studies using this model have been shown that serotonin (5-HT) plays an inhibitory role in the regulation of the escape behavior, indicating a panicolytic-like effect. Activation of serotonergic receptors in the dPAG also inhibits the escape response generated by another experimental model that relates this defensive reaction to panic, the elevated T maze (ETM). Besides escape, this model also measures inhibitory avoidance, a defensive response associated with generalized anxiety disorder. Previous studies in the ETM indicate that intra-dPAG injection of 5-HT generates anxiogenic-like and panicolytic-like effects. Indirect evidence suggests that the anxiogenic-like effect of 5-HT can be mediated by 5-HT_{2C} receptors. On the other hand, the panicolytic-like effect can be modulated by 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. In this study we further explore the role of 5-HT_{2C} receptors of dPAG in the regulation of defense responses associated to the anxiety and to the panic, measured in ETM. To this end, we evaluated the effects of intra-dPAG injection of MK-212 and RO-600175, preferential agonists of 5-HT_{2C} receptors, and SB-242084, a selective antagonist of 5-HT_{2C} receptors. The results showed that the MK-212 and RO-600175 facilitated the acquisition of inhibitory avoidance, indicating anxiogenic-like effect, without affecting the escape response. Furthermore, previous microinjection of SB-242084 in the dPAG prevented the anxiogenic effect generated by MK-212. Regarding the participation of 5-HT_{2C} receptors in the regulation of responses associated with the panic, we found that MK-212 didn't change the escape response induced by electrical stimulation of the dPAG. Thus, our results suggest that the anxiogenic-like effect of 5-HT on the inhibitory avoidance response is mediated by 5-HT_{2C} receptors. Although the activation of these receptors promotes anxiogenic-like effect in the ETM, it does not affect the escape response, indicating that the 5-HT_{2C} receptors are involved in the regulation of defensive responses associated with generalized anxiety, but not panic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Ansiedade e as reações de defesa.....	16
1.2. Substância Cinzenta Periaquedutal	21
1.3. A serotonina e os transtornos de ansiedade	22
1.4. A serotonina e o labirinto em T elevado	25
1.5. Receptores 5-HT _{2C} e Ansiedade	29
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Animais.....	35
3.2. Drogas.....	35
3.3. Aparatos experimentais	35
3.3.1. <i>Labirinto em T elevado</i>	35
3.3.2. <i>Campo Aberto</i>	36
3.3.3. <i>Quimitrodo e arena para avaliação da fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD</i>	37
3.4. Procedimentos.....	38
3.4.1. <i>Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas ou quimitrodo</i>	38
3.4.2. <i>Habituação</i>	39
3.4.3. <i>Exposição prévia a um dos braços abertos do labirinto em T elevado</i>	40
3.4.4. <i>Injeções intra-SCPD</i>	40
3.4.5. <i>Testes Comportamentais</i>	41
3.4.5.1. <i>Labirinto em T elevado</i>	42
3.4.5.2. <i>Campo aberto</i>	42
3.4.5.3. <i>Estimulação elétrica da SCPD</i>	43
3.5. Perfusão	44
3.6. Histologia.....	44
3.7. Análise estatística dos resultados	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Análise Histológica	46
4.2. Experimento 1	47

4.3. Experimento 2.....	49
4.4. Experimento 3.....	53
4.5. Experimento 4.....	55
4.6. Experimento 5.....	56
4.7. Tabela 1	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade e as reações de defesa

A ansiedade é caracterizada por uma sensação de receio ou apreensão, aparentemente, sem causa evidente. A esse estado emocional se agregam alterações somáticas, cognitivo-subjetivas e comportamentais, como sudorese, taquicardia, dificuldade de concentração, irritabilidade e perturbações do sono (Graeff, 1999).

Em humanos, a ansiedade e o medo são considerados estados emocionais de grande valor adaptativo. Essas emoções auxiliam o indivíduo a evitar prejuízos ao organismo, levando ao desempenho de respostas adequadas e necessárias à sobrevivência (Pratt, 1992; Graeff, 1994). Porém, em níveis maiores, a ansiedade pode prejudicar o desempenho e causar prejuízos, sendo considerada patológica (Zangrossi e Graeff, 1997; Graeff, 2004). Certos estados de ansiedade são considerados transtornos psiquiátricos e requerem tratamento psicológico e/ou farmacológico.

A ansiedade patológica pode ser resultado de outros eventos, como outras doenças, psiquiátricas ou não, e neste caso pode ser considerada uma manifestação secundária. No entanto, a ansiedade é considerada primária quando sua manifestação é o único sintoma de um quadro clínico, caracterizando os distúrbios de ansiedade.

Os transtornos de ansiedade são considerados como entidades clínicas desde 1869, quando Beard relacionou o termo “neurastenia” com quadros clínicos de fadiga física de origem nervosa, acompanhada de sintomas característicos de ansiedade aguda e depressão. Posteriormente, Freud (1895; apud Pereira, 2004) empregou o termo “neurose de angústia”, primeiramente utilizado em trabalhos de Ewald Hecker (1893), para representar um complexo de sintomas que seria diferente da neurastenia. De acordo com Freud, a neurose de angústia apresentava-se sob duas formas: como um estado crônico e como uma crise de angústia (ataques de ansiedade).

Estudos de Donald Klein (1962, 1964) mostravam que os ataques de ansiedade eram reduzidos, após a terceira semana de tratamento com a imipramina, porém, os sintomas de ansiedade antecipatória diminuía somente em longo prazo. Diante disso, Klein (1980) diferenciou a ansiedade crônica dos ataques de ansiedade (ataques de pânico). A ansiedade crônica foi caracterizada como uma angústia crônica e flutuante, sem ataques de pânico, na qual o tratamento com a imipramina não foi eficaz. Enquanto que os ataques de pânico foram descritos como ataques de ansiedade que eram reduzidos com o tratamento com imipramina.

Embora a classificação dos transtornos mentais venha evoluindo desde 1840, a classificação dos transtornos de ansiedade foi tardia. Estes distúrbios foram classificados em diferentes categorias pela Associação Psiquiátrica Americana (APA) e foram concretamente separados a partir da terceira edição (1980) do Manual de Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais (DSM). Mais recentemente, no ano de 2000, a APA publicou um texto revisado da quarta edição do DSM, o DSM IV – RT, no qual não há modificações de critérios diagnósticos, mas apresenta comentários e propostas de diagnósticos adicionais à quarta edição. De acordo com o DSM IV – RT, os Transtornos de Ansiedade são classificados em:

- Transtorno de pânico com ou sem agorafobia
- Transtorno de ansiedade generalizada
- Agorafobia sem história de transtorno de pânico
- Fobia social (transtorno de ansiedade social)
- Fobia específica
- Transtorno obsessivo-compulsivo
- Transtorno de estresse agudo ou pós-traumático
- Transtorno de ansiedade SOE (sem outra especificação)
- Transtorno devido a uma condição médica geral
- Transtorno de ansiedade induzido por uma substância

Levando-se em consideração o objetivo do presente trabalho, descreveremos brevemente os transtornos de ansiedade generalizada e do pânico, conforme as definições do DSM IV – RT.

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é caracterizado por preocupações excessivas, na maioria dos dias, que persistem por pelo menos seis meses, acompanhadas de no mínimo três sintomas adicionais para adultos e apenas um sintoma no caso de crianças. Os sintomas considerados são: inquietação, fadigabilidade, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular ou perturbações no sono. Além disso, há dificuldade em controlar a constante preocupação que, em adultos, está mais relacionada a circunstâncias cotidianas, enquanto que no caso das crianças, a preocupação excessiva é com a qualidade de seu desempenho.

Por sua vez, o transtorno de pânico (TP) é essencialmente caracterizado pela presença de ataques de pânico recorrentes e inesperados, seguidos por pelo menos um mês de preocupações persistentes acerca de ter outro ataque de pânico ou preocupações com as implicações ou conseqüências do ataque anterior ou ainda a presença de alguma alteração comportamental significativa. Um ataque de pânico é descrito como um período de intenso temor ou desconforto, acompanhados de pelo menos quatro dos seguintes sintomas: palpitações ou ritmo cardíaco acelerado, sudorese, tremores, sensações de falta de ar ou sufocamento, dor ou desconforto torácico, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio, sensação de irrealidade ou despersonalização, medo de perder o controle ou enlouquecer, medo de morrer, parestesias e ondas de calor.

Procurando desvendar o mecanismo desses distúrbios, estudos clínicos e experimentais vêm sendo realizados. Esses estudos têm sido favorecidos pelo uso de modelos animais de ansiedade, os quais permitem a investigação das bases neurobiológicas

desses distúrbios, bem como a avaliação de novos agentes potencialmente terapêuticos. Tais modelos fundamentam-se na interpretação das emoções à visão evolutiva.

Com base nesta perspectiva evolutiva de Darwin (1872), publicada em seu livro *The expression of emotions in man and animals*, as emoções humanas têm sido correlacionadas a respostas comportamentais emitidas por animais. Segundo Darwin (1872, apud Graeff, 1990; Panksepp, 1990), o homem tendo animais como seus ancestrais, compartilharia com eles não só características físicas, mas também suas emoções básicas. Sendo assim, estados emocionais como o medo e a ansiedade humanos teriam raízes filogenéticas nos comportamentos defensivos de animais diante de estímulos aversivos (Finger, 1994). Esses comportamentos de defesa vêm sendo associados com transtornos de ansiedade, como o transtorno de ansiedade generalizada e do pânico (Blanchard *et al.*, 1993; Graeff e Zangrossi, 2002).

Estas associações são fundamentadas por vários trabalhos, entre eles, o trabalho do casal Blanchard com a análise de estratégias defensivas de roedores em resposta a diferentes tipos de ameaça predatória. Analisando estas estratégias de defesa, os pesquisadores propuseram que o nível de ameaça que o estímulo representa é um dos fatores determinantes para a escolha do tipo de resposta comportamental defensiva. Assim, os estímulos de ameaça foram classificados em potencial, distal e proximal. Cada um desses estímulos gera respostas defensivas distintas, representadas em níveis de defesa (Blanchard e Blanchard, 1988, 1989).

No primeiro nível de defesa, quando a ameaça é potencial (incerta), o comportamento emitido é cauteloso, como as respostas de avaliação de risco e esquiva inibitória. Neste caso, estudos revelam que estruturas como o complexo amigdalóide e o sistema hipocampal estariam envolvidos nesse tipo de comportamento (Blanchard *et al.*, 1993, 2003; Graeff, 1994, 2004; Gray Mcnaughton, 2000).

No segundo nível, quando o perigo é real, ou seja, o predador está presente, mas se apresenta a certa distância, a resposta gerada é de fuga ou congelamento, no caso da fuga não ser possível. O substrato neural envolvido nesse nível de defesa foi proposto por Davis e colaboradores (1992), a partir de estudos da resposta de sobressalto potencializada pelo medo. Eles propuseram que a via que parte do núcleo central do complexo amigdalóide para a parte ventral da substância cinzenta periaquedutal (SCPV) é essencial para a expressão de congelamento gerado por estímulos aversivos.

O terceiro nível de defesa ocorre em situação de perigo proximal, quando o predador ou ameaça está muito próximo ou em contato direto com a presa, levando à emissão de respostas de fuga explosiva ou agressão defensiva. Com base em estudos pioneiros de Hess e seus seguidores (Hess e Brugger, 1943; Hunsperger, 1956; Fernandez de Molina e Hunsperger, 1959), foi proposto que o terceiro nível de defesa estaria associado à substância cinzenta periaquedutal (SCP). Eles mostraram que a estimulação elétrica da SCP de gatos provocava respostas de defesa como ataques defensivos e fuga explosiva. Posteriormente, baseado em evidências experimentais associadas a achados clínicos, Graeff (1994, 2002, 2004) correlacionou os comportamentos observados no terceiro nível de defesa com o transtorno de pânico.

A estimulação elétrica de outras áreas cerebrais, tais como o complexo amigdalóide e o hipotálamo medial, também gerava respostas defensivas e alterações autonômicas similares às respostas a ameaças naturais (Hess e Brugger, 1943; Hunsperger, 1956). Além disso, pacientes neurocirúrgicos que sofreram estimulação da SCP relataram sensações de medo intenso ou pânico e morte eminente, acompanhados de alterações fisiológicas como taquicardia, dispnéia, dor torácica profunda, sensação de calor ou frio, e urgência de micção (Nashold *et al.*, 1969, 1974; Young, 1989). A partir desses e de vários outros estudos, Graeff (1981) propôs que as respostas a estímulos aversivos seriam

elaboradas por um sistema cerebral composto principalmente pelo complexo amigdalóide, hipotálamo medial e a SCP. Inicialmente, esse sistema foi denominado Sistema Cerebral Aversivo (Graeff, 1981) e posteriormente, foi chamado de Sistema Cerebral de Defesa (Graeff e Guimarães, 1999).

1.2. Substância Cinzenta Periaquedutal

A SCP é uma estrutura mesencefálica, organizada longitudinalmente, que circunda o aqueduto de Sylvius (Carrive, 1993). A SCP recebe projeções diretas da medula espinal e do núcleo trigeminal espinal. Tais conexões sugerem a participação dessa estrutura no processamento de estímulos somatossensoriais, como da nocicepção (Carrive, 1993). Além disso, as conexões da SCP com estruturas prosencefálicas, como o complexo amigdalóide, o córtex límbico, o hipotálamo e os núcleos dorsal e mediano da rafe, sugerem que a SCP seja importante na gênese/expressão de estados emocionais (Carrive, 1993).

Baseando-se em critérios anatômicos, a SCP é dividida em quatro colunas – dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral – as quais se estendem ao longo do eixo rostro-caudal (Bandler *et al.*, 1991, 2000). No presente trabalho, investigamos a participação da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), compreendendo as colunas dorsomedial e dorsolateral, na regulação de respostas defensivas.

Evidências indicam que a SCPD tem participação importante em processos emocionais como o medo e a ansiedade (Graeff, 1990, 1994; Bandler e Shipley, 1994; Lovick, 2000). A estimulação elétrica ou química desta área mesencefálica produz reações defensivas como comportamento de fuga e alterações neurovegetativas, sugerindo que o animal esteja passando por uma experiência marcadamente aversiva, indicando que essa

estrutura desempenha importante papel no comportamento defensivo (Olds e Olds, 1962; Graeff *et al.*, 1993a).

Assim, baseado nas similaridades entre as respostas autonômicas e comportamentais da estimulação da SCPD e os sintomas de ataques de pânico, tem sido sugerido que a SCPD esteja envolvida na gênese do transtorno de pânico em humanos (Deakin e Graeff, 1991). Desde então, a estimulação aversiva desta estrutura em animais de laboratório tem sido utilizada como modelo experimental de ataques de pânico (Jenck *et al.*, 1995; Lovick, 2000; Schenberg *et al.*, 2001).

A partir de experimentos baseados na correlação dessas respostas defensivas evocadas por animais com o medo e a ansiedade humanos, diversos sistemas de neurotransmissão têm sido propostos como mediadores das respostas comportamentais defensivas. Entre os sistemas sugeridos, estão o serotoninérgico, GABAérgico, glutamatérgico, da colecistocinina e do fator liberador de corticotropina (Guimarães *et al.*, 1991; Brandão *et al.*, 1994; Graeff, 1994, 2002; Zangrossi *et al.*, 2001; Zanoveli *et al.*, 2004). O presente trabalho destaca o envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação desses comportamentos defensivos.

1.3. A serotonina e os transtornos de ansiedade

Evidências indicam que a administração sistêmica ou intra-SCPD de agonistas serotoninérgicos inibe a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica ou química dessa estrutura, indicando que a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) pode inibir respostas associadas ao pânico.

Assim, estudos mostram que o comportamento de pressionar uma alavanca para reduzir ou finalizar a estimulação elétrica aplicada na SCPD de ratos é facilitado pela administração sistêmica do inibidor da síntese de 5-HT, a para-cloro-fenilalanina (p-CPA;

Kiser e Lebovitz, 1975) ou pela administração de dois antagonistas serotoninérgicos, a metisergida e a ciproheptadina (Schenberg e Graeff, 1978). Por outro lado, este comportamento é inibido pelo precursor da síntese de 5-HT, o 5-hidroxitriptofano (5-HTP), ou pelo inibidor de recaptção de 5-HT, a clomipramina (Kiser *et al.*, 1978).

Com o objetivo de estudar a ação direta de drogas serotoninérgicas na SCPD, alguns estudos foram realizados utilizando quimitrodos implantados cronicamente na SCPD, os quais permitem estudar os efeitos das drogas microinjetadas no mesmo sítio onde a estimulação elétrica produz efeito aversivo.

Foi mostrado que a injeção intra-SCPD de drogas que mimetizam ou facilitam a atividade serotoninérgica causavam claro efeito antiaversivo (Schutz *et al.*, 1985; Audi *et al.*, 1988; Nogueira e Graeff, 1991).

Utilizando o modelo de estimulação elétrica, tem sido mostrado que a administração intra-SCPD de agonistas de receptores dos tipos 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT e preferencial 5-HT_{2A} DOI inibe a resposta de fuga, caracterizando um efeito do tipo panicolítico (Nogueira e Graeff, 1995). Por outro lado, o agente panicogênico CCK-4, capaz de induzir ataques de pânico em humanos, facilita a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD de ratos, sugerindo um efeito do tipo panicogênico (Bertoglio *et al.*, 2007). O mesmo efeito é observado com a administração local do antagonista de receptores GABA_A bicuculina (Casaroto *et al.*, 2010).

Em outros modelos experimentais de ansiedade, como os testes de conflito, a 5-HT parece aumentar a ansiedade. Diferentemente da estimulação elétrica da SCPD, os modelos animais de conflito avaliam a inibição comportamental. Nestes modelos, o comportamento operante do animal é mantido pela apresentação de uma recompensa e simultaneamente suprimido por estímulos aversivos, como por exemplo, choques elétricos nas patas (Geller e Seifter, 1960).

As primeiras evidências surgiram na década de 70 e foram baseadas na avaliação do comportamento de supressão induzida por punição. Nestes estudos, a administração sistêmica do inibidor da síntese de 5-HT p-CPA e de dois antagonistas serotoninérgicos não-seletivos, a metisergida e o ácido bromolisérgico, promoveram efeitos do tipo ansiolítico (Robichaud e Sledge, 1969; Graeff e Schoenfeld, 1970). Corroborando esses dados, um estudo com a administração do precursor de 5-HT 5-HTP preveniu o efeito ansiolítico provocado pelo p-CPA (Geller e Blum, 1970).

Adicionalmente, Wise e colaboradores (1972) evidenciaram que o benzodiazepínico oxazepam, na mesma dose que desencadeava efeito ansiolítico em testes de conflito, também causava diminuição dos níveis de 5-HT no mesencéfalo. Dessa forma, surgiu a proposta de que a 5-HT modularia a ansiedade a partir da ação em regiões prosencefálicas e mesencefálicas. Além disso, os autores sugeriram que os benzodiazepínicos desencadeariam o efeito ansiolítico à medida que diminuíssem a liberação de 5-HT nessas regiões encefálicas.

Essa primeira proposta sobre o papel da 5-HT na ansiedade foi corroborada por estudos de Tye e colaboradores (1977). Eles observaram que ao diminuir os níveis corticais de 5-HT, o comportamento de supressão por punição era inibido. Esse comportamento era liberado quando antagonistas serotoninérgicos eram administrados no núcleo basolateral do complexo amigdalóide (Peterson e Scheel-Kruger, 1984). Além disso, a administração de agonistas serotoninérgicos nesta mesma estrutura foi capaz de aumentar a supressão induzida pela punição, caracterizando o efeito ansiogênico da 5-HT (Hodges *et al.*, 1987).

Na tentativa de conciliar as evidências aparentemente contraditórias sobre o papel da 5-HT na ansiedade, Deakin e Graeff (1991) formularam uma hipótese quanto ao papel dual da 5-HT na modulação de respostas defensivas relacionadas com o TAG e o TP. Essa hipótese considera que esse neurotransmissor possa desempenhar um papel diferencial,

principalmente em duas estruturas do Sistema Cerebral de Defesa, o complexo amigdalóide e a SCPD.

As fibras serotoninérgicas que inervam o complexo amigdalóide e a SCPD, através dos tratos prosencefálico e periventricular respectivamente, são provenientes do núcleo dorsal da rafe (NDR), que juntamente com o núcleo mediano da rafe (NMR), representam a principal fonte de neurônios serotoninérgicos que se projetam ao encéfalo anterior por vias ascendentes (Azmitia e Segal, 1978; Vertes, 1991). Para os autores, as projeções serotoninérgicas que inervam essas duas estruturas encefálicas seriam ativadas mediante um perigo potencial e liberariam 5-HT em ambas as estruturas. No complexo amigdalóide, o aumento dos níveis de 5-HT facilitaria o comportamento de esquiva inibitória, enquanto que na SCPD o aumento desse neurotransmissor levaria à inibição de respostas de fuga. Considerando a importância do complexo amigdalóide para a aprendizagem do medo, essa estrutura estaria mais relacionada a respostas mais elaboradas, correlacionadas com a ansiedade antecipatória e o TAG. Por outro lado, a SCPD, principal estrutura responsável pelas respostas defensivas mediante perigos reais e proximais, estaria relacionada com o TP. Assim, clinicamente a 5-HT seria capaz de aumentar a ansiedade, agindo no complexo amigdalóide, e inibir ataques de pânico ao atuar na SCPD (Deakin e Graeff, 1991; para revisão ver Graeff, 2002, 2004).

1.4. A serotonina e o labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado (LTE) foi desenvolvido por Graeff e colaboradores (Graeff *et al.*, 1993b) visando testar a hipótese do papel dual da 5-HT na ansiedade (Deakin e Graeff, 1991). Este modelo experimental é derivado do labirinto em cruz elevado (Pelow *et al.*, 1985; Viana *et al.*, 1994) e permite avaliar separadamente em um

mesmo animal dois comportamentos defensivos, a esquiva inibitória e a fuga, os quais estão relacionados respectivamente, com o TAG e o TP (Graeff *et al.*, 1993b).

O labirinto em T elevado é constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões, elevados 50 cm em relação ao solo. Um dos braços é circundado por paredes laterais e está disposto perpendicularmente aos dois outros braços que permanecem desprovidos de paredes (Graeff *et al.*, 1993b, 1997, 1998; Zangrossi *et al.*, 2001).

A fim de verificar o comportamento de esquiva inibitória, os animais são colocados por três vezes consecutivas na extremidade distal do braço fechado e em cada uma destas tentativas é verificada a latência gasta para sair, com as quatro patas, deste braço. Devido ao medo inato que roedores possuem de locais abertos e altos (Treit *et al.*, 1993; Montgomery, 1995), os animais aprendem a se esquivar dos braços abertos, quando colocados repetidamente no braço fechado do labirinto (Zangrossi e Graeff, 1997; Graeff *et al.*, 1998; Zangrossi *et al.*, 2001). Isto faz com que eles permaneçam, a cada tentativa, mais tempo dentro do braço fechado, indicando a aquisição da resposta de esquiva inibitória (Graeff e Zangrossi, 2004). É importante ressaltar que essa aversão gerada em roedores pela exposição a locais elevados e abertos confere ao LTE a vantagem de evocar respostas defensivas sem o uso de procedimentos arbitrários à espécie, como por exemplo, choques nas patas (Graeff e Zangrossi, 2004; Soares e Zangrossi, 2004).

Após a verificação da esquiva inibitória, é verificado o comportamento de fuga dos animais. Para tal, os animais são colocados na extremidade distal de um dos braços abertos, também por três vezes consecutivas, e o tempo gasto para sair deste braço, com as quatro patas, é registrado em cada uma das tentativas.

Alguns estudos foram desenvolvidos para validar farmacologicamente este modelo. Um desses estudos mostrou que a administração sistêmica de diazepam e buspirona, usados no tratamento do TAG, é capaz de desencadear efeito ansiolítico

também no LTE (Graeff *et al.*, 1998). Esses tratamentos prejudicaram a esQUIVA inibitória, diminuindo a latência de saída do braço fechado, sem alterar a resposta de fuga.

Estudos com antidepressivos tricíclicos como a imipramina mostraram que a administração aguda desse composto é capaz de aumentar a latência de esQUIVA inibitória (Teixeira *et al.*, 2000). No entanto, se esse composto for administrado cronicamente (21 dias) observa-se redução na latência de esQUIVA inibitória e aumento da latência de fuga dos animais (Teixeira *et al.*, 2000; Zanoveli *et al.*, 2005). Esses achados vêm de acordo com dados clínicos de que antidepressivos tricíclicos podem aumentar a ansiedade no início do tratamento e só atingem a eficácia clínica, tanto no TAG como no TP, após algumas semanas de uso repetido (Johnson *et al.*, 1995). A resposta de fuga também foi inibida pela administração crônica das drogas panicolíticas clomipramina, escitalopram e fluoxetina (Poltronieri *et al.*, 2003; Stahl *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2008). Os resultados destes e de outros estudos baseados na administração sistêmica de drogas em animais testados no LTE permitiram reforçar a correlação entre a resposta de esQUIVA inibitória e o TAG e da resposta de fuga com o TP (Graeff *et al.*, 1993b).

Utilizando esse mesmo modelo, Zanoveli e colaboradores (2003) mostram que a microinjeção de 5-HT na SCPD não promove apenas o efeito do tipo panicolítico, diminuindo a expressão da resposta de fuga, mas também desencadeia um efeito ansiogênico. Este estudo investigou o efeito da injeção intra-SCPD de agonistas serotoninérgicos sobre a aquisição da resposta de esQUIVA inibitória e expressão do comportamento de fuga no LTE. A administração de 5-HT ou do agonista não seletivo de receptores 5-HT_{2C} mCPP facilitou a aquisição da esQUIVA inibitória, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico. No entanto, o agonista do receptor 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT apresentou efeito ansiolítico, enquanto que o agonista preferencial 5HT_{2A} DOI não alterou esse comportamento. Em relação à fuga, todos os agonistas serotoninérgicos empregados nesse

estudo inibiram esse comportamento, sugerindo o efeito do tipo panicolítico (Zanoveli *et al.*, 2003).

Na busca por evidências mais claras sobre o papel de receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da SCPD na regulação de comportamentos defensivos, foram realizados estudos de antagonismo no LTE (Soares e Zangrossi, 2004). Tais estudos revelaram que o efeito do tipo ansiogênico promovido pela injeção intra-SCPD de 5HT foi prevenido pela microinjeção prévia do antagonista preferencial de receptores 5HT_{2A} quetanserina e preferencial 5HT_{2C} SDZ-SER082, mas não pela injeção do antagonista de receptores 5HT_{1A} WAY-100635. Adicionalmente a esses efeitos, os antagonistas quetanserina e SDZ-SER082 também preveniram o efeito do tipo panicolítico da 5-HT observado na resposta de fuga (Soares e Zangrossi, 2004).

Neste mesmo sentido, outras análises experimentais no LTE mostram que a administração intra-SCPD do antagonista quetanserina é capaz de prevenir os efeitos ansiogênico e panicolítico promovidos pela estimulação química do NDR (Pobbe e Zangrossi, 2005). Levando em consideração que estudos prévios já haviam indicado que a estimulação dos neurônios do NDR leva à liberação de 5-HT na SCPD, promovendo os mesmos efeitos observados após a microinjeção desse agonista endógeno, ou seja, a facilitação da esquiva inibitória e inibição da resposta de fuga (Graeff *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 1997).

Com base nesses resultados, Soares e Zangrossi propuseram que o efeito ansiogênico da 5HT na SCPD é mediado por receptores do tipo 5-HT_{2C}, visto que a ativação dos receptores 5-HT_{1A} com 8-OH-DPAT teve efeito oposto e, o agonista preferencial de receptores 5HT_{2A} DOI não alterou a resposta de esquiva inibitória. Em relação à resposta de fuga, segundo os autores, o efeito panicolítico da 5-HT sobre essa resposta poderia ser mediado por receptores dos tipos 5-HT_{1A}, 5HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

No entanto, a observação de que o antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A} quetanserina bloqueou o efeito ansiogênico gerado pela 5-HT na SCPD suscita dúvidas quanto ao envolvimento único dos receptores 5-HT_{2C} neste processo e indica que esse efeito também pode ser mediado pelos receptores do tipo 5-HT_{2A}. Vale ressaltar que, embora a quetanserina possua maior afinidade pelos receptores 5HT_{2A} (Ki=8,13 nmol), essa droga também é capaz de se ligar a receptores do tipo 5-HT_{2C} (Ki=61,66 nmol; Knight *et al.*, 2004).

Além disso, apesar do agonista mCPP ter gerado efeito panicolítico e esse mesmo efeito quando promovido pela 5-HT ter sido bloqueado pelo antagonista SDZ-SER082, a participação dos receptores 5-HT_{2C} na resposta de fuga também não é clara. Embora o agonista mCPP e o antagonista SDZ-SER082 possuam maior afinidade pelos receptores 5-HT_{2C} (mCPP/Ki=14,12 nmol; SDZ/Ki=7,59 nmol), essas drogas também podem se ligar a outros receptores serotoninérgicos, como por exemplo 5-HT_{2A} (mCPP/Ki=54,96 nmol; SDZ/Ki=512,86nmol; Knight *et al.*, 2004), cuja ativação gera efeito inibitório sobre a resposta de fuga no LTE (Zanoveli *et al.*, 2003; Soares e Zangrossi, 2004).

Com base nas evidências apresentadas, no presente trabalho, procuramos estender as investigações sobre o papel dos receptores 5-HT_{2C} da SCPD na modulação dos comportamentos defensivos evocados no labirinto em T elevado, através da administração de agonistas e antagonistas mais seletivos.

1.5. Receptores 5-HT_{2C} e Ansiedade

Evidências indicam que o receptor 5HT_{2C} está envolvido na regulação de funções fisiológicas como a ingestão alimentar e a secreção hormonal, influenciando também na atividade locomotora e no controle das emoções (Kahn e Wetzeler, 1991; Kennett, 1993).

Entretanto, a real compreensão do papel dos receptores 5-HT_{2C}, tanto no controle das funções fisiológicas como dos estados emocionais, tem sido dificultada pela falta de ligantes mais seletivos e pela própria natureza complexa desses receptores. Por exemplo, no processo de síntese dos receptores 5-HT_{2C} podem ocorrer alterações na transcrição do mRNA e conseqüente modificação na síntese protéica, gerando até 24 isoformas diferentes, que variam quanto à distribuição encefálica e à afinidade pela 5-HT (Quirk *et al.*, 2001; Gurevich *et al.*, 2002a; Werry *et al.*, 2008). Além disso, estados de estresse e/ou depressão ou ainda tratamentos com antidepressivos podem alterar a edição do mRNA, modificando os tipos de isoformas expressas em determinadas áreas encefálicas (Gurevich *et al.*, 2002b; Giorgetti e Tecott, 2004; Englander *et al.*, 2005).

Os receptores 5-HT_{2C} estão estrategicamente localizados em estruturas cortico-límbicas implicadas na etiologia e modulação de estados emocionais. Clemett e colaboradores (2000), utilizando análises imunistoquímicas, mostraram a existência de altos níveis de receptores 5HT_{2C} no bulbo olfatório, córtex, núcleo caudado putâmen, núcleo accumbens, estriado, septo, hipocampo, complexo amigdalóide (núcleos medial, lateral e basolateral), tálamo, hipotálamo, SCP (regiões dorsal, lateral e ventral) e NDR.

A ativação dos receptores 5HT_{2C} em áreas límbicas como o complexo amigdalóide e o hipocampo tem sido associada ao desencadeamento da ansiedade. Por exemplo, Campbell e Merchant (2003) mostram que a injeção dos agonistas de receptores 5-HT_{2C} m-CPP e IL-639 no núcleo basolateral do complexo amigdalóide promove efeito ansiogênico no teste do campo aberto. Tal efeito é prevenido pelo antagonista seletivo de receptores 5HT_{2C}, SB-242084. Na mesma direção, Alves e colaboradores (2003) mostram que a administração do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C} MK-212 no hipocampo ventral desencadeia efeito do tipo ansiogênico no labirinto em cruz elevado.

Esses dados corroboram as evidências de que a administração sistêmica de agonistas de receptores 5-HT_{2C} promove efeitos do tipo ansiogênico em diferentes modelos experimentais (para revisão ver Griebel, 1995; Griebel *et al.*, 1997). Por exemplo, a injeção sistêmica de MK-212 promove efeito do tipo ansiogênico no LCE (de Mello Cruz *et al.*, 2005). Além disso, estudos tanto em roedores (Kennett *et al.*, 1989) como em humanos (Kahn e Wetzeler, 1991; Kennett *et al.*, 1993) já haviam mostrado que a administração sistêmica de mCPP gera respostas do tipo ansiogênica. Entretanto, no que diz respeito à administração de antagonistas de receptores 5-HT_{2C}, evidências experimentais e clínicas indicam que esses antagonistas têm propriedades ansiolíticas (Millan, 2003). Diante desses efeitos supostamente mediados por receptores 5-HT_{2C}, o bloqueio desses receptores tem sido alvo de estudo para novas estratégias de tratamento dos estados de depressão e ansiedade, não só pelo efeito benéfico nos sintomas desses estados emocionais, mas também por evitar efeitos indesejáveis comuns em tratamentos com antidepressivos.

Baseado nestas e outras evidências, Millan (2005) sugere que a ativação de receptores 5-HT_{2C} esteja envolvida no efeito ansiogênico observado no início do tratamento com inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS). Por outro lado, o tratamento prolongado com esses antidepressivos levaria à dessensibilização dos receptores 5-HT_{2C} com a conseqüente diminuição da ansiedade (Millan, 2003, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estender as investigações sobre o papel dos receptores 5HT_{2C} da SCPD na mediação de comportamentos defensivos medidos no labirinto em T elevado (LTE), através da observação dos efeitos da administração local de agonistas e antagonistas desse subtipo de receptor serotoninérgico.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da injeção intra-SCPD dos agonistas preferenciais de receptores 5HT_{2C} MK-212 (experimento 1) e RO-600175 (experimento 2) sobre as respostas defensivas evocadas no LTE;
- Verificar se a microinjeção prévia do antagonista seletivo de receptores 5HT_{2C} SB-242084 é capaz de prevenir os efeitos no LTE da administração de MK-212 na SCPD (experimento 3);
- Para fins comparativos, investigar o efeito da injeção de MK-212 na SCPD sobre a resposta de fuga gerada em outro modelo experimental associado ao pânico, a estimulação elétrica da SCPD (experimento 4);
- Por fim, verificar se a injeção intra-SCPD de SB-242084 é capaz de bloquear os efeitos no LTE gerados pela administração local do agonista endógeno 5-HT (experimento 5).

Para averiguar se os tratamentos farmacológicos realizados interferem com a atividade locomotora, após o teste no LTE, todos os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, experimentalmente ingênuos, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, com peso entre 230-250g no momento da cirurgia estereotáxica. Os animais foram mantidos em caixas comunitárias no biotério do laboratório antes e após a cirurgia estereotáxica para o implante da cânula ou do quimitrodo. Entre a chegada dos animais do Biotério Central do Campus e o término do experimento, os animais permaneceram no biotério do laboratório, com livre acesso à água e alimento, sob um ciclo de luz claro/escuro de 2 horas (7 às 19 horas) e temperatura controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: 5-HT (5-hidroxitriptamina, Sigma, EUA); MK-212 [hidroclorato de 6-Cloro-2-(1-piperazinil) pirazine; Tocris, EUA], RO-600175 [fumarato de (aS)-6-Cloro-5-fluor-a-metil-1H-indol-1-etanamina; Tocris, EUA], SB-242084 {hidroclorato pirrolidina de (2R)-1-[(3-hidroxifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)]; Tocris, EUA}. Para a solubilização do agonista RO-600175, na maior dose, foi utilizada uma solução contendo salina com 4% de DMSO (dimetil-sulfóxido, Sigma, EUA) e as demais drogas foram dissolvidas em salina estéril a 0,9%.

3.3. Aparatos experimentais

3.3.1. Labirinto em T elevado

O labirinto em T elevado (LTE, figura 1) é constituído por três braços de madeira com 50 cm de comprimento e 12 cm de largura, cada. Um dos braços é protegido por paredes laterais de 40 cm de altura e fica perpendicular aos dois outros braços. Tais braços

são considerados abertos, pois não possuem as paredes de madeira, mas são circundados por 1 cm de acrílico transparente para evitar quedas dos animais. O aparato está elevado 50 cm em relação ao solo.



Figura 1 – Labirinto em T elevado

3.3.2. Campo Aberto

Em uma arena quadrada de madeira foi realizado o teste do campo aberto, a fim de verificar a atividade locomotora dos animais testados no LTE. Esta arena possui 360 cm² e paredes laterais de 40 cm de altura (figura 2) e situa-se numa sala experimental com 40 lux, medidos no quadrado central da arena.



Figura 2 – Campo aberto

3.3.3. Quimitrodo e arena para avaliação da fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD

A estimulação elétrica da SCPD foi realizada por meio de um quimitrodo (figura 3) implantado nesta estrutura encefálica por meio da cirurgia estereotáxica descrita posteriormente. O quimitrodo consiste de um eletrodo conectado a uma cânula-guia, a qual foi construída a partir de uma agulha hipodérmica comercial, possuindo 13,0 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo. O eletrodo foi construído a partir de um fio de aço inoxidável, flexível, de 250 µm de diâmetro, isolado em toda sua extensão, exceto nas secções transversas das extremidades. Um segmento desse fio foi soldado a um pino inoxidável e o outro segmento foi colado paralelamente à metade distal de uma cânula-guia, ultrapassando-a em 1 mm. A estimulação elétrica do tecido cerebral ocorreu a partir da secção transversa distal do eletrodo.

As sessões de estimulação elétrica da SCPD foram realizadas em uma cuba de acrílico com tampa (40 cm de diâmetro e 39 cm de altura; figura 4) com serragem em seu assoalho para reproduzir as condições da gaiola-viveiro do animal. Uma tela de *nylon* disposta na parte superior da cuba impediu que os animais saltassem para fora da área do teste durante as sessões de estimulação elétrica. A tela de *nylon* possui uma abertura em seu centro, que permite a passagem de um conector elétrico giratório de mercúrio ligado a dois canais de saídas. A primeira saída está ligada a um estimulador, que gerou corrente senoidal de 60 Hz e corrente constante (Marseillan, 1977). A corrente elétrica aplicada foi monitorada por meio de um osciloscópio (Pantec-5205 – 10mHz) ligado em paralelo ao aparelho estimulador. A segunda saída é conectada a um cabo flexível, que se encaixa ao quimitrodo fixado ao crânio do animal, permitindo a passagem de corrente elétrica para a SCPD. Este aparato permitiu a livre movimentação do animal na cuba.



Figura 3 - Quimitrodo

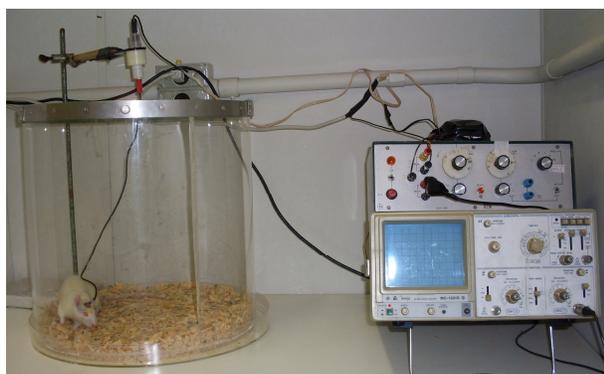


Figura 4 – Arena

3.4. Procedimentos

3.4.1. Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas ou quimitrodo

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica no 3º dia após a chegada no biotério do laboratório. Eles foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich – EUA) a 2,5% (10 mL/Kg, i.p.) e a tricotomia foi realizada. Após a cirurgia, os animais receberam uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil – 1mL/Kg, intra-muscular) e Banamine (Schering-Ploug S/A – Brasil), um agente analgésico, antiinflamatório e antitérmico (1mL/Kg, sub-cutâneo).

Os animais foram então adaptados a um aparelho estereotáxico (Stoelting Co – EUA), com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural. A seguir, foi realizada a limpeza do campo cirúrgico com uma solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%. Na região da incisão foi administrado, via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol 100, S.S. White – Brasil). Poucos minutos após, foi realizada uma incisão longitudinal dos tecidos cutâneos e subcutâneos a fim de expor a calvária e remover o perióstio por raspagem.

Na seqüência, dois orifícios foram perfurados na calota craniana, com o auxílio de uma broca dental tipo Dremel, para a introdução de parafusos de aço inoxidável, com a finalidade de prender a prótese de acrílico ao crânio. Um outro orifício foi perfurado a uma distância de 1,9 mm lateral ao lambda para a introdução da cânula ou do quimitrodo. A cânula (12mm), de mesmo material que a cânula guia do quimitrodo, foi introduzida a uma profundidade de 3,2 mm abaixo da superfície craniana, com uma inclinação de 22° em relação ao plano sagital, evitando-se, assim, a perfuração do seio venoso, enquanto o quimitrodo foi introduzido a uma profundidade de 5,2 mm. Para manter a cânula ou a cânula-guia do quimitrodo desobstruídas, foi colocado no interior destas um mandril de aço de 0,3 mm de diâmetro de mesmo comprimento das cânulas, o qual foi retirado apenas no momento da sessão experimental. Após o implante, a cânula ou o quimitrodo foram fixados à calota craniana por meio de resina dental autopolimerizável.

Após a cirurgia, os animais foram retornados ao biotério do laboratório, onde permaneceram até a realização dos testes comportamentais.

3.4.2. Habituação

Nos dois dias que antecederam os testes, os animais foram manipulados em uma das salas experimentais por 5 minutos e logo após, foram colocados individualmente em uma caixa 39 x 32 x 16 cm, onde permaneceram por mais 5 minutos. Esses procedimentos foram realizados com a finalidade de que os animais se habituassem às condições pelas quais seriam submetidos no dia dos testes. A iluminação nas salas onde a habituação e os testes foram realizados era de 40 lux e havia um ruído de fundo constante produzido por exaustores de ar.

3.4.3. Exposição prévia a um dos braços abertos do labirinto em T elevado

Estudos mostraram que a exposição prévia a um dos braços abertos do LTE reduz as reações comportamentais à novidade, como a inibição comportamental, aumentando a expressão da resposta de fuga (Teixeira *et al.*, 2000). Diante disso, o teste do LTE tem sido conduzido utilizando esse método.

Vinte e quatro horas antes do teste, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos. Durante 30 minutos o animal permaneceu nesse braço aberto, o qual foi isolado dos outros braços por uma parede de madeira.

3.4.4. Injeções intra-SCPD

Durante a injeção, os animais permaneceram com livre movimentação em uma gaiola-viveiro (39 x 32 x 16 cm) com serragem no assoalho. Após sorteio prévio, a injeção intra-SCPD foi realizada por meio de uma agulha dental do tipo *Mizzy*, com 0,3 mm de diâmetro externo e 14,0 mm de comprimento, introduzida na cânula ou cânula-guia do quimitrodo. A agulha foi conectada a uma microsseringa (Hamilton 701-RN – EUA) de 10 µL por meio de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido previamente com água. Uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno separou a água da droga a ser administrada. Durante a injeção, o deslocamento desta bolha foi utilizado para monitorar a microinjeção. Para controlar o volume e o tempo de injeção, foi utilizada uma bomba microinjetora digital (KD Scientific – EUA), de forma que um volume de 0,2 µL de droga foi microinjetado durante 2 minutos, exceto para a injeção de RO-600175 e 5-HT, em que fora injetado um volume de 0,4 µL durante 2 minutos. O aumento do volume de microinjeção foi necessário devido a dificuldades de solubilização destas drogas. Após a microinjeção, a agulha permaneceu no sítio de injeção por mais 1 minuto, a fim de evitar o refluxo da droga.

3.4.5. Testes Comportamentais

Cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

No experimento 1, os animais foram submetidos ao LTE após receberem injeções do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C} MK-212 (0,01; 1 e 10 nmol) ou salina (n= 8 a 12). As doses testadas foram baseadas em estudos prévios desse agonista em outras estruturas, como o complexo amigdalóide (Vicente, 2009).

No experimento 2, procuramos investigar os efeitos no LTE de outro agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C}, o RO-600175 (4 e 20 nmol; n= 9 a 13). As doses testadas foram escolhidas com base em estudos prévios da microinjeção desse agonista no córtex pré-frontal medial (Leggio *et al.*, 2008). Em um grupo independente de animais, verificamos o efeito da microinjeção de uma maior dose do mesmo agonista, RO-600175 (40nmol; n=9 a 10), ou veículo (salina e DMSO), sobre as respostas evocadas no LTE.

Para esclarecer o papel dos receptores 5-HT_{2C} na modulação de respostas defensivas evocadas no LTE, no experimento 3, investigamos se um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{2C}, o SB-242084, na dose de 10 nmol, seria capaz de prevenir os efeitos produzidos pela microinjeção de MK-212 (1 nmol). Assim, os grupos formados foram salina – salina (n=10), salina – SB (n=8), salina – MK (n=10), SB – MK (n=9).

Para fins comparativos aos experimentos 1 e 2, verificamos no experimento 4 se o limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD é alterado pela microinjeção do agonista MK-212 (0,01; 1 e 10 nmol; n=6 a 11). Para tal, o limiar de fuga de cada animal foi determinado antes e após a administração local de MK-212 ou salina.

No experimento 5, verificamos o efeito da microinjeção do antagonista SB-242084 (1 e 10 nmol) ou salina previamente à injeção do agonista endógeno 5-HT (20 nmol) ou salina sobre as respostas emitidas no LTE. Assim, os grupos formados foram

salina – salina (n=12), salina – SB 1 nmol (n=11), salina – SB 10 mol (n=12), SB 1 nmol – salina (n=13), SB 10 nmol – salina (n=11), SB 10 nmol – 5-HT (n=13).

Os testes foram iniciados 10 minutos após a última microinjeção. Nos experimentos 4 e 5, os animais receberam a segunda injeção 5 minutos após a administração intra-SCPD do antagonista SB-242084.

3.4.5.1. Labirinto em T elevado

No LTE, primeiramente foi investigada a esquivia inibitória. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e o tempo gasto para sair deste braço com as quatro patas foi registrado (Linha de Base). Após a saída do braço fechado, o animal foi levado para a mesma caixa que permaneceu durante cinco minutos nas habituações dos dias anteriores. Depois de 30 segundos, o animal foi novamente colocado no braço fechado (Esquivia 1) e isto se repetiu por mais uma vez (Esquivia 2). O tempo máximo de permanência no braço fechado foi de 5 minutos, em quaisquer das tentativas.

Para a verificação da resposta de fuga, 30 segundos após a Esquivia 2, o animal foi colocado na extremidade distal do mesmo braço aberto onde foi pré-exposto, e o tempo gasto para sair deste braço com as quatro patas foi cronometrado (Fuga 1). Este procedimento se repetiu mais duas vezes (Fugas 2 e 3), levando em consideração os intervalos de 30 segundos entre as tentativas.

3.4.5.2. Campo aberto

Após 30 segundos da verificação da Fuga 3, o animal foi colocado no centro da arena para a observação da atividade locomotora e seu deslocamento foi registrado por 5 minutos. A distância total percorrida foi analisada pelo programa Ethovision 1.96 (Noldus – Holanda).

3.4.5.3. Estimulação elétrica da SCPD

Para tal, primeiramente, o mandril foi cuidadosamente retirado da cânula e, a seguir, uma simulação de microinjeção foi realizada a fim de igualar as condições experimentais de pré e pós-injeção da droga. Nessa simulação, a agulha dental (13 mm) não ultrapassou o comprimento da cânula-guia e nenhuma substância foi microinjetada. Após 10 minutos, o cabo flexível foi conectado ao quimitrodo e o animal foi colocado na cuba por 5 minutos para adaptar-se às condições experimentais. E logo após, foi iniciada a determinação dos limiares aversivos, por meio da estimulação elétrica da SCPD.

A determinação do limiar de fuga (limiar aversivo) foi iniciada com um estímulo elétrico com intensidade de 20 μA . O tempo de cada estímulo elétrico foi de 10 segundos, seguidos de intervalos de 10 segundos. Após cada intervalo, um novo estímulo, 4 μA maior que o precedente, foi aplicado ao animal, até a obtenção dos limiares de fuga. O limiar de fuga foi considerado como a menor intensidade de corrente elétrica capaz de induzir fuga por três tentativas consecutivas. Neste caso, os animais apresentaram corrida na arena, que foram ou não acompanhada por saltos verticais. Quando a fuga não foi observada até a intensidade de corrente elétrica de 152 μA , o animal foi excluído do experimento.

Após 10 minutos da determinação do limiar basal de fuga, o agonista MK-212 ou salina foram microinjetados na SCPD de acordo com um sorteio prévio. Para cada animal, a alteração no limiar aversivo (Δ em μA), causada pela microinjeção da droga ou salina na SCPD foi computada e representada como a diferença entre o limiar de fuga determinado após o tratamento farmacológico e o limiar basal de fuga.

3.5. Perfusão

Para a verificação da localização do sítio de estimulação, após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 4% e 0,2 µL do corante azul de Evans foi microinjetado na SCPD. Logo após, os animais sofreram perfusão intracardíaca com salina, seguida de uma solução de formol a 10%. Os encéfalos foram removidos e armazenados em formol a 10%, até a data da confecção das lâminas histológicas.

3.6. Histologia

Os encéfalos foram cortados em secções coronais de 50 µm de espessura por meio de um criostato de congelamento (Leica CM1850), para verificação macroscópica do sítio de estimulação, segundo as fotomicrografias do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram incluídos na análise estatística somente os dados dos animais que tiveram o sítio de estimulação localizado na SCPD (porções dorsomedial e dorsolateral).

3.7. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos no LTE foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, sendo considerado como fator independente o tratamento farmacológico e como medidas repetidas as latências de saída do braço fechado (Linha de Base, Esquivas 1 e 2,) ou as latências de saída do braço aberto (Fugas 1, 2 e 3). Quando necessário, foram realizadas comparações múltiplas pelos testes de Duncan ou *t* de Student. Os dados da distância percorrida no campo aberto e da estimulação elétrica foram analisados por meio da ANOVA de uma via seguidos de comparações múltiplas de Duncan ou quando apropriado, os dados foram submetidos ao teste *t* de Student.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Os sítios de microinjeção na SCPD dos quatro experimentos estão representados na figura 5. A percentagem média de acerto desta estrutura foi de 70%.

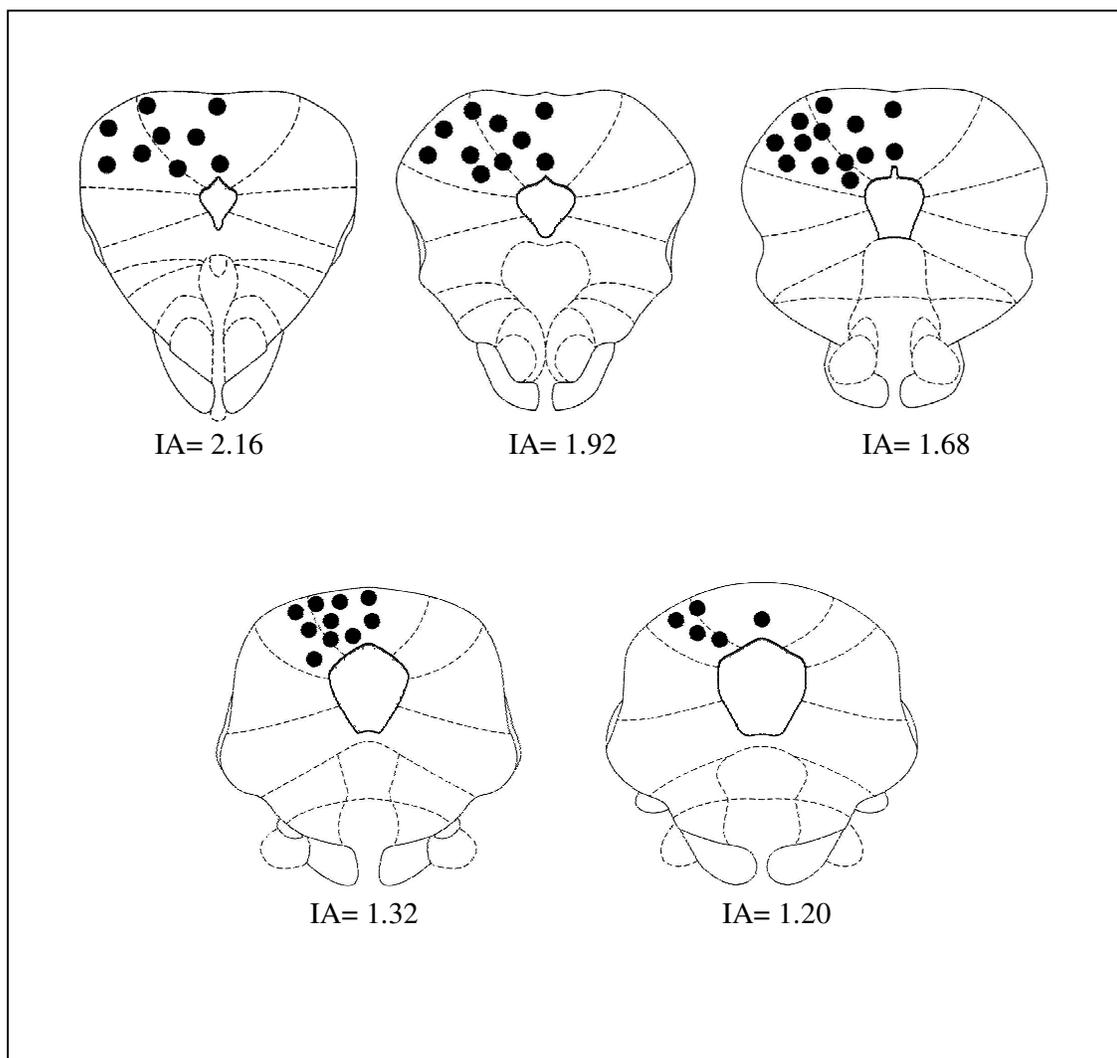


Figura 5 – Representação dos sítios de microinjeção na SCPD observados nos quatro experimentos, através do plano ântero-posterior (IA – interaural 1.2 a 2.16) conforme o Atlas Paxinos e Watson (2007). O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

4.2. Experimento 1

Efeitos da administração intra-SCPD do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C} MK-212

As respostas de esquiva inibitória dos animais que receberam injeções intra-SCPD de MK-212 ou salina podem ser observadas na figura 6A. De acordo com os resultados da ANOVA de medidas repetidas, houve aumento da latência de saída dos animais do braço fechado do LTE ao longo das tentativas, indicando a aquisição de esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,72)=32,39$; $p<0,01$]. Houve efeito do tratamento [fator tratamento: $F(3,36)=4,04$; $p<0,05$], mas não foi constatada interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(6,72)=0,8$; NS]. O teste de Duncan mostrou que o tratamento com MK-212 na dose de 1 nmol aumentou as latências de saída do braço fechado na Linha de Base (LB) e na Esquiva 1 (E1), enquanto que na dose de 10 nmol, apenas a latência da Esquiva 2 (E2) foi aumentada em relação ao grupo salina, indicando efeito do tipo ansiogênico.

A figura 6B mostra a ausência de efeito da injeção intra-SCPD de MK-212 sobre o comportamento de fuga dos animais no LTE. A ANOVA mostrou que não houve efeito das tentativas [fator tentativa: $F(2,72)=0,87$; NS], do tratamento [fator tratamento: $F(3,36)=0,65$; NS], nem interação entre tratamento e tentativas [fator interação: $F(6,72)=0,86$; NS].

Em relação à atividade locomotora, observa-se na tabela 1 que o tratamento com MK-212 não alterou a distância percorrida pelos animais [$F(3,39)=0,86$; NS]

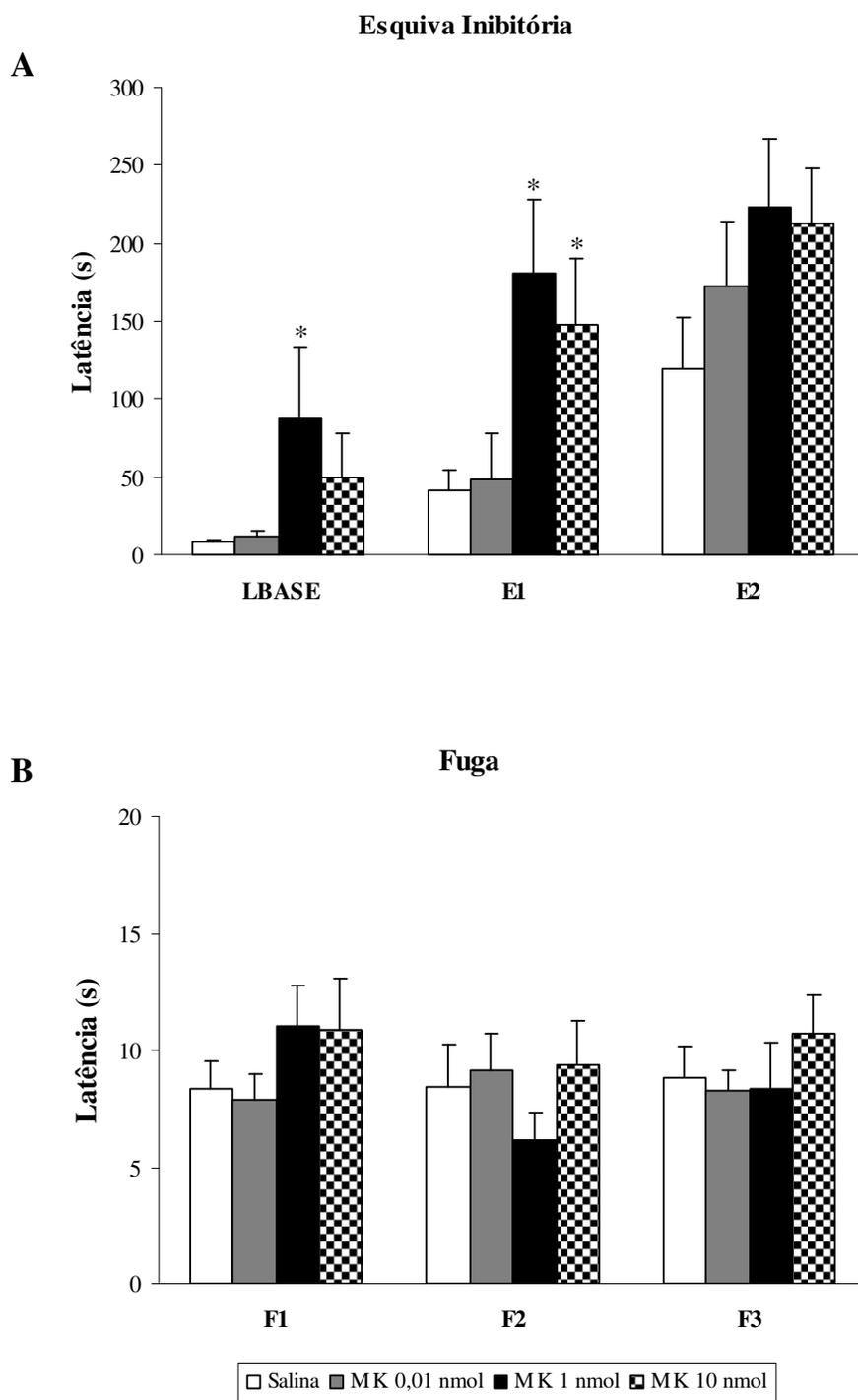


Figura 6 – Média \pm EPM da latência de saída do braço fechado (A) e de um dos braços abertos (B) de animais submetidos ao labirinto em T elevado após a injeção intra-SCPD de MK-212 ou salina (n= 8 a 12). LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

4.3. Experimento 2

Efeitos da administração intra-SCPD do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C} RO-600175

A figura 7A mostra o comportamento de esquiva inibitória de animais que receberam injeções intra-SCPD de RO-600175 (4 e 20 nmol) ou salina. A ANOVA mostrou que houve aquisição de esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,62)=20,31$; $p<0,01$]. Não houve efeito do tratamento [fator tratamento: $F(2,31)=1,0$; NS], nem interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(4,62)=0,69$; NS].

A injeção intra-SCPD de RO-600175 (4 e 20 nmol) também não alterou o comportamento de fuga dos animais no LTE, conforme ilustrado na figura 7B. A ANOVA mostrou que não houve efeito das tentativas [fator tentativa: $F(2,62)=1,31$; NS], do tratamento [fator tratamento: $F(2,31)=1,72$; NS], nem interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(4,62)=0,26$; NS].

Em relação à atividade locomotora, observa-se na tabela 1 que o tratamento com RO-600175 (4 e 20 nmol) não alterou a distância total percorrida pelos animais [$F(2,33)=1,36$; NS].

Na figura 8A, está ilustrada a resposta de esquiva inibitória de animais que receberam microinjeções de RO-600175 (40 nmol) ou veículo (salina e DMSO). A ANOVA mostrou que houve aquisição de esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,34)=14,64$; $p<0,01$], bem como efeito do tratamento [fator tratamento: $F(1,17)=19,81$; $p<0,01$] e interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(2,34)=3,28$; $p=0,05$]. O teste *t* de Student mostrou que o tratamento com RO-600175 na dose de 40 nmol aumentou

as latências de saída do braço fechado na Esquiva 1 (E1) e na Esquiva 2 (E2) em relação ao grupo que recebeu veículo, indicando efeito do tipo ansiogênico.

A resposta de fuga dos animais que receberam microinjeção de RO-600175 (40 nmol) foi representada na figura 8B. A ANOVA mostrou que não houve efeito das tentativas [fator tentativa: $F(2,34)=0,08$; NS], do tratamento [fator tratamento: $F(1,17)=2,12$; NS], nem interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(2,34)=0,65$; NS].

A microinjeção na SCPD de RO-600175 na dose de 40 nmol alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto, conforme observado na tabela 1. O teste t de Student mostrou que a distância percorrida pelos animais que receberam a microinjeção deste agonista foi significativamente menor em relação ao grupo que recebeu veículo [$t(17)=4,19$; $p<0,01$]. Para averiguar se a redução da distância total percorrida pelos animais interferiu nas respostas medidas no LTE, os dados da esquiva inibitória foram covariados com a distância total percorrida pelos animais no campo aberto. Essas análises mostraram que o efeito do RO-600175 (40 nmol) em facilitar a aquisição da esquiva inibitória é independente da alteração causada pela droga sobre a locomoção [fator tratamento pós-covariação: $F(1,16)=10,67$; $p<0,01$].

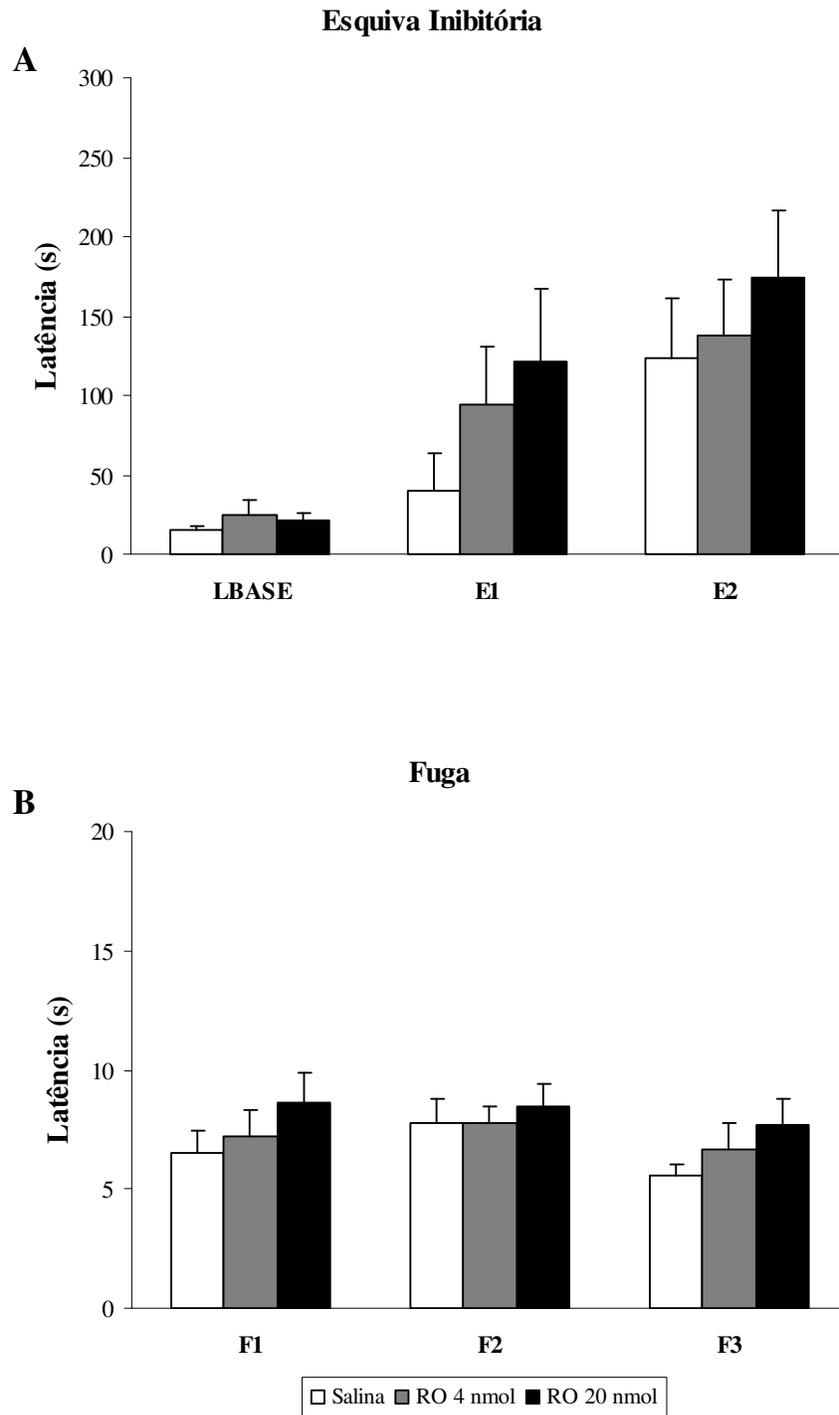


Figura 7 – Média \pm EPM da latência de saída do braço fechado (A) e de um dos braços abertos (B) de animais submetidos ao labirinto em T elevado após a injeção intra-SCPD de RO-600175 ou salina (n= 9 a 13). LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga.

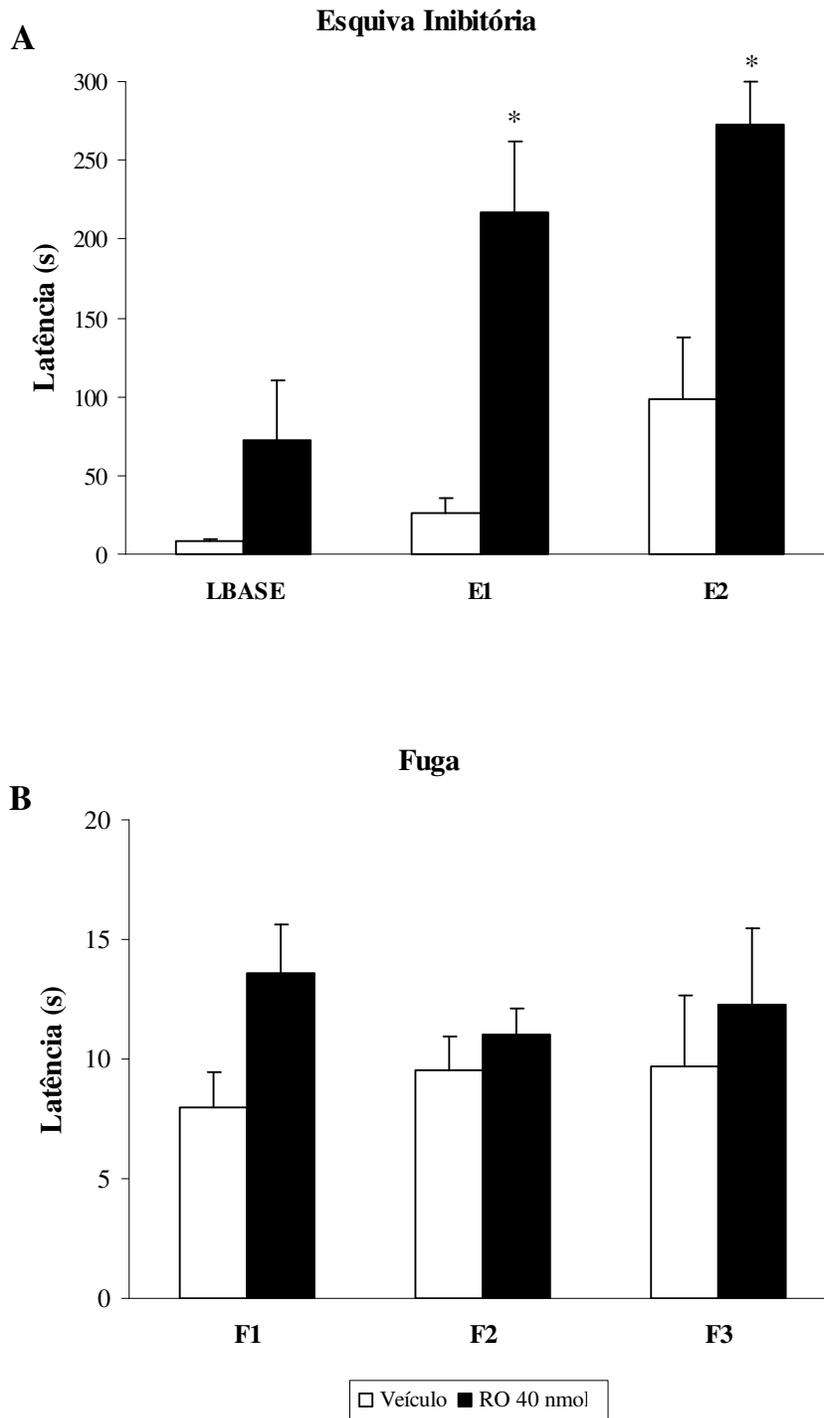


Figura 8 – Média \pm EPM da latência de saída do braço fechado (A) e de um dos braços abertos (B) de animais submetidos ao labirinto em T elevado após a injeção intra-SCPD de RO-600175 ou veículo (n= 9 a 10). LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

4.4. Experimento 3

Efeitos da administração intra-SCPD de SB-242084 previamente à microinjeção de MK-212

A figura 9A mostra a resposta de esquiva inibitória dos animais submetidos ao LTE que receberam injeções de SB-242084 ou salina previamente à microinjeção do agonista serotoninérgico MK-212 ou salina. A ANOVA mostrou que houve aquisição de esquiva inibitória [fator tentativa: $F(2,66)=17,61$; $p<0,01$] e efeito do tratamento [fator tratamento: $F(3,33)=3,11$; $p<0,05$]. Entretanto, não foi constatada interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(6,66)=1,82$; NS]. O teste de Duncan mostrou que o tratamento com MK-212 (salina-MK-212) aumentou as latências de saída do braço fechado na Esquiva 2 (E2) em relação ao grupo controle (salina-salina), indicando efeito do tipo ansiogênico e o antagonista SB-242084 preveniu tal efeito.

Os tratamentos realizados não alteraram o comportamento de fuga dos animais no LTE, conforme ilustrado na figura 9B. A ANOVA mostrou que não houve efeito das tentativas [fator tentativa: $F(2,66)=0,67$; NS], do tratamento [fator tratamento: $F(3,33)=0,46$; NS], nem interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(6,66)=1,19$; NS].

Na tabela 1 observa-se que a distância percorrida pelos animais no campo aberto também não foi alterada pelos tratamentos centrais [$F(3,36)=0,43$; NS].

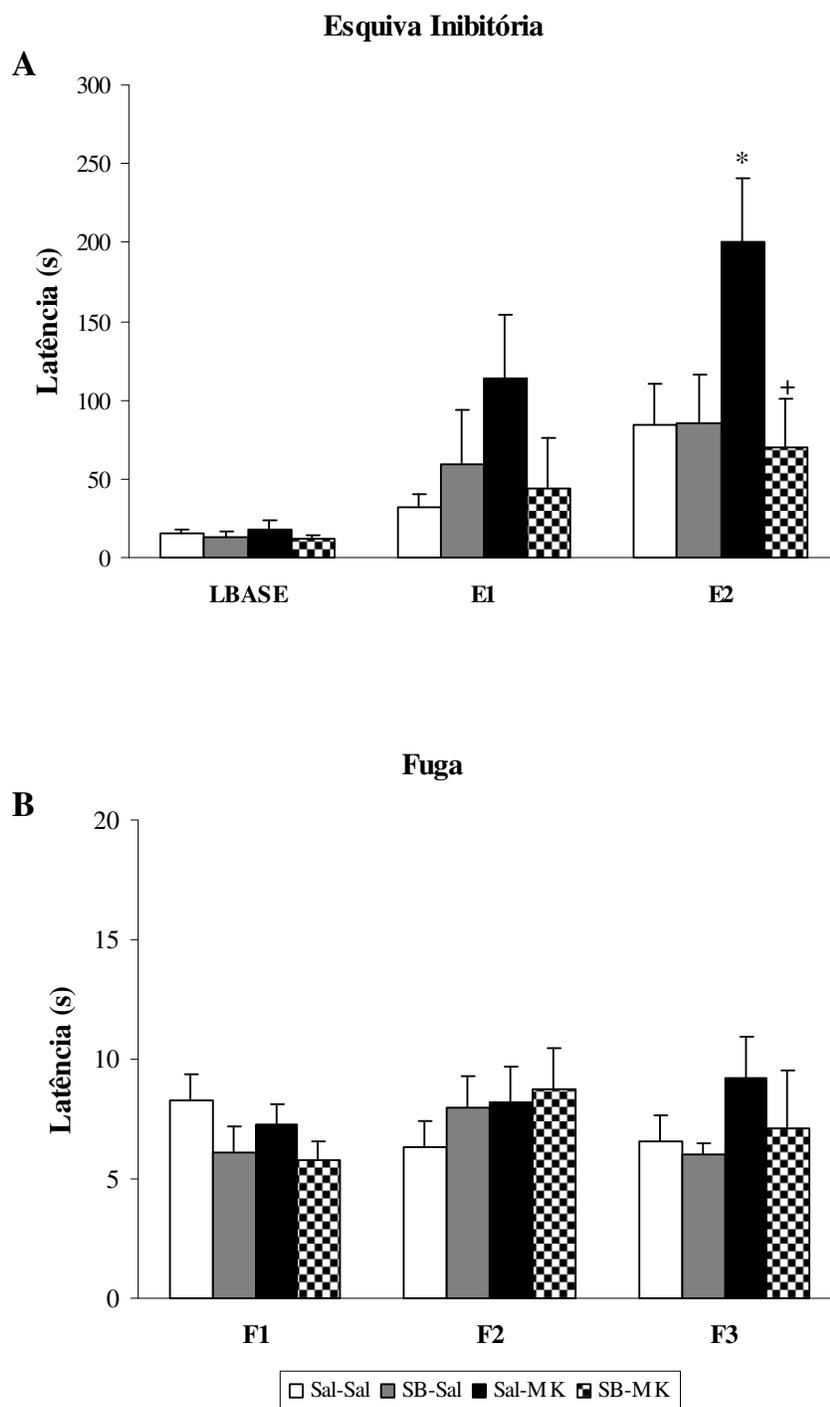


Figura 9 – Efeito (média \pm EPM) da injeção intra-SCPD de SB-242084 ou salina 10 minutos antes da microinjeção de MK-212 ou salina sobre as latências de esquiva inibitória (A) e de fuga (B) medidas no labirinto em T elevado (n= 8-10). LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina-salina; + $p < 0,05$ em relação ao grupo sal-MK-212.

4.5. Experimento 4

Efeitos da administração intra-SCPD de MK-212 sobre a resposta de fuga induzida pela Estimulação Elétrica da SCPD

Observa-se na figura 10 que administração de MK-212 não foi capaz de alterar o limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD [$F(3,29)=0,34$; NS].

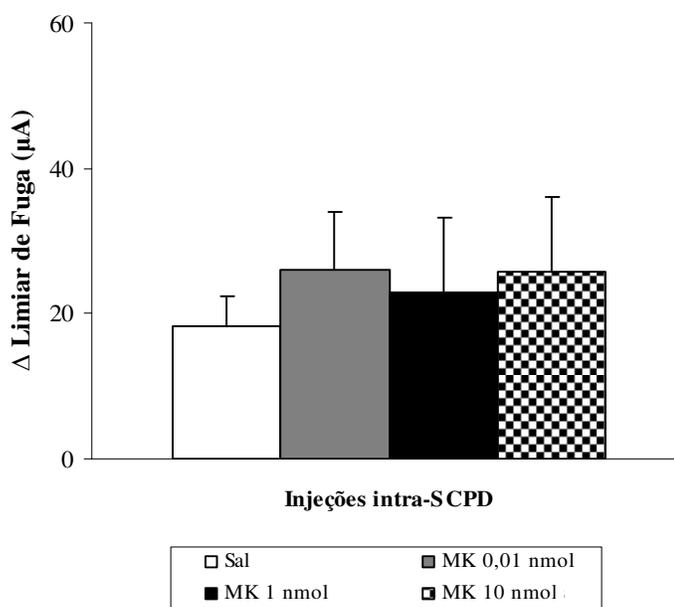


Figura 10 - Média \pm EPM da variação (Δ) do limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD de animais após a microinjeção de MK-212 na SCPD (n= 6 a 11).

4.6. Experimento 5

Efeitos da administração intra-SCPD de SB-242084 previamente à microinjeção de 5-HT

As latências de saída do braço fechado dos animais que receberam injeções intra-SCPD de SB-242084 ou salina previamente à microinjeção de 5-HT (20nmol) ou salina pode ser observado na figura 11A. De acordo com os resultados da ANOVA, houve aquisição de esQUIVA inibitória [fator tentativa: $F(2,132)=50,61$; $p<0,01$] e efeito do tratamento [fator tratamento: $F(5,66)=9,71$; $p<0,01$]. Em relação à interação entre os fatores tratamento e tentativas, foi constatado efeito marginal [fator interação: $F(10,132)=1,74$; $p=0,08$]. O teste de Duncan mostrou que o tratamento com 5-HT (salina-5-HT) aumentou as latências de saída do braço fechado na Linha de Base (LB) e nas EsQUIVA 1 e 2 (E1, E2) em relação ao grupo controle (salina-salina), indicando efeito do tipo ansiogênico. O antagonista SB-242084 na dose de 10 nmol, mas não na dose de 1 nmol, foi capaz de prevenir tal efeito.

A figura 11B mostra o efeito da injeção intra-SCPD de SB-242084 ou salina previamente à microinjeção de 5-HT ou salina sobre o comportamento de fuga dos animais no LTE. A ANOVA mostrou que não houve efeito das tentativas [fator tentativa: $F(2,132)=1,03$; NS]. O tratamento alterou essa resposta [fator tratamento: $F(5,66)=5,50$; $p<0,01$], mas não houve interação entre os fatores tratamento e tentativas [fator interação: $F(10,132)=0,64$; NS]. De acordo com o teste de Duncan, o tratamento com o agonista endógeno 5-HT (salina-5-HT) promoveu aumento significativo das latências de saída do braço aberto nas Fugas 1, 2 e 3, quando comparadas com o grupo controle, indicando efeito panicolítico. Tal efeito não foi prevenido pela injeção prévia de SB-242084 na dose de 1 nmol, mas foi atenuado, ainda que não significativamente, por este antagonista na maior dose (10 nmol).

Em relação à atividade locomotora, os tratamentos realizados não alteraram a distância percorrida pelos animais no campo aberto [$F(5,71)=1,91$; NS], conforme mostrado na tabela 1.

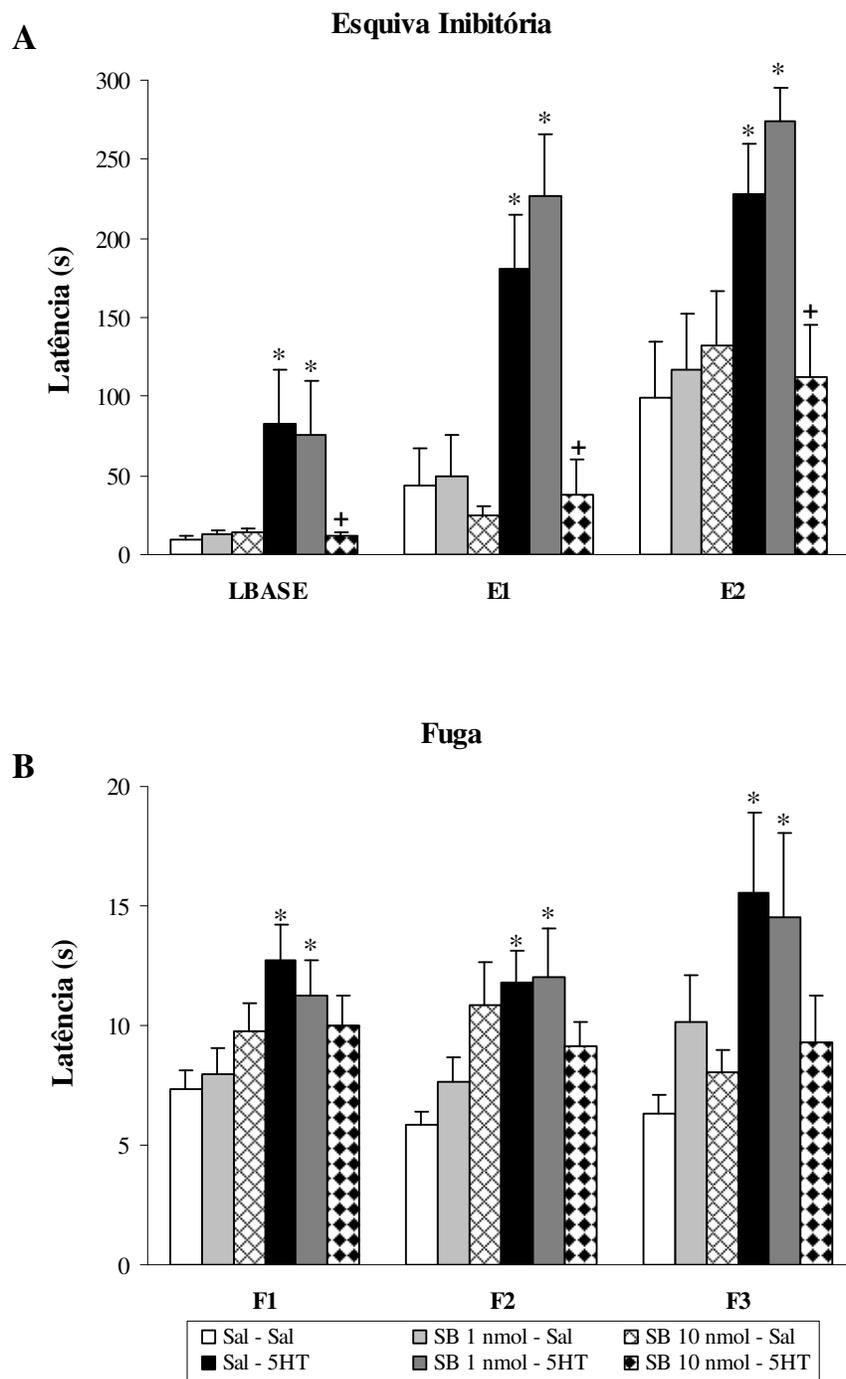


Figura 11 – Efeito (média \pm EPM) da injeção intra-SCPD de SB-242084 ou salina 10 minutos antes da microinjeção de 5-HT ou salina sobre as latências de esquiva inibitória (A) e de fuga (B) medidas no labirinto em T elevado (n= 11 a 13). LB: linha de base; E: esquiva; F: fuga. * $p < 0.05$ em relação ao grupo salina-salina; + $p < 0,05$ em relação ao grupo sal-5-HT.

4.7. Tabela 1

**Média \pm EPM da distância percorrida (DP) no teste do campo aberto
pelos animais submetidos a injeções intra-SCPD de
5-HT, MK-212, RO-600175 e SB-242084**

Tratamento	DP (m)
Experimento 1	
Salina	26,90 \pm 1,61
MK 0,01 nmol	30,58 \pm 2,21
MK 1 nmol	29,72 \pm 2,41
MK 10 nmol	25,89 \pm 2,09
Experimento 2	
Salina	32,80 \pm 1,63
RO 4 nmol	27,76 \pm 2,36
RO 20 nmol	30,51 \pm 2,88
Veículo	22,16 \pm 1,05
RO 40 nmol	13,61 \pm 1,68 *
Experimento 4	
Sal – Sal	27,23 \pm 2,68
SB – Sal	31,67 \pm 4,05
Sal – MK	27,49 \pm 3,01
SB – MK	27,74 \pm 2,58
Experimento 5	
Sal - Sal	26,85 \pm 1,79
SB 1 nmol – Sal	25,11 \pm 1,73
SB 10 nmol – Sal	27,01 \pm 2,71
Sal-5HT	22,02 \pm 1,79
SB 1 nmol – 5-HT	22,09 \pm 1,77
SB 10 nmol – 5-HT	21,34 \pm 1,23

* p<0,05 em relação ao grupo veículo.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o intuito de se investigar o papel dos receptores do tipo 5-HT_{2C} da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) na modulação de respostas defensivas emitidas no labirinto em T elevado (LTE).

No primeiro experimento realizado, verificamos que a administração intra-SCPD do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C} MK-212 (5-HT_{2C}/K_i = 97,7 nmol, 5-HT_{2A}/K_i = 1023,3 nmol; Knight *et al.*, 2004), nas doses de 1 e 10 nmol, aumentou a latência de esquiva inibitória no LTE, sem afetar a resposta de fuga, indicando a participação de receptores 5-HT_{2C} neste efeito do tipo ansiogênico. Vale ressaltar que a microinjeção desse agonista não alterou a distância total percorrida pelos animais no teste do campo aberto, indicando que os resultados obtidos no LTE não foram influenciados por alterações na atividade locomotora dos animais.

Quando verificamos o efeito da injeção intra-SCPD de outro agonista de receptores 5-HT_{2C}, o RO-600175 (5-HT_{2C}/K_i = 6 nmol, 5-HT_{2A}/K_i = 36,3 nmol; Knight *et al.*, 2004), observamos que nas doses de 4 e 20 nmol não houve alteração nas respostas defensivas geradas no LTE. Contudo, quando utilizada a dose de 40 nmol, observamos que a latência de esquiva inibitória foi aumentada, sem qualquer efeito na resposta de fuga. No entanto, diferentemente do MK-212, a administração dessa maior dose de RO-600175 reduziu significativamente a distância total percorrida pelos animais no teste do campo aberto, indicando comprometimento da atividade locomotora. Contudo, apesar deste potencial déficit motor, a resposta de fuga não foi alterada. Além disso, embora a administração intra-SCPD de 40 nmol de RO-600175 tenha reduzido a distância total percorrida pelos animais no campo aberto, uma análise de covariância indicou que esta alteração na atividade locomotora não influenciou o efeito observado sobre resposta de esquiva inibitória.

Desta forma, os resultados obtidos com estes dois agonistas sugerem que receptores 5-HT_{2C} na SCPD estejam primariamente envolvidos na regulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade (esquiva inibitória) e não ao pânico (fuga).

Confirmando o envolvimento dos receptores 5-HT_{2C} no efeito ansiogênico promovido pela administração intra-SCPD do agonista MK-212, no experimento 3 observamos que este efeito foi bloqueado pela microinjeção do antagonista seletivo de receptores 5-HT_{2C} SB-242084, ressaltando que nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora e que o antagonista, por si só, não exibiu qualquer efeito.

Os resultados do experimento 4 mostram que a administração do agonista MK-212, nas mesmas doses testadas no LTE, não alterou o limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD, reforçando a hipótese de que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} nessa estrutura não afeta esse comportamento.

Outros estudos no modelo da estimulação elétrica da SCPD e no LTE também dão suporte a esta hipótese. Ainda que não seletivo para receptores 5-HT_{2C}, o agonista mCPP tem sido frequentemente utilizado em investigações acerca do papel desses receptores na modulação de comportamentos defensivos. Nogueira e Graeff (1995) mostraram que a microinjeção de 16 ou 32 nmol de mCPP não foi capaz de alterar o limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD. Da mesma forma, no LTE, a injeção intra-SCPD de doses baixas desse agonista (10 e 20 nmol) não foi capaz de alterar as respostas de esquiva inibitória e fuga, porém, quando testada a dose de 40 nmol, observaram-se efeitos do tipo ansiogênico e panicolítico (Zanoveli *et al.*, 2003). Recentemente, estudos em nosso laboratório observaram que a microinjeção de 40 nmol de mCPP é capaz de inibir a fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD e este efeito é bloqueado pela microinjeção do antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}

quetanserina, sugerindo que, nessa dose, o mCPP esteja atuando em receptores do tipo 5-HT_{2A} (Thatiane de Oliveira Sergio e Hélio Zangrossi Júnior, 2010; dados não publicados).

Curiosamente, estudos em camundongos, utilizando o labirinto em cruz elevado, mostram que a injeção intra-SCP de mCPP promove efeito do tipo ansiolítico, o qual é atenuado pela microinjeção prévia de quetanserina. Os autores propõem que esse efeito ansiolítico do mCPP seja mediado por receptores do tipo 5-HT_{2C} da SCP (Nunes de Souza *et al.*, 2008). Entretanto, a preferência que a quetanserina apresenta para receptores 5HT_{2A}, conforme discutido na introdução, não exclui a possibilidade de que o efeito ansiolítico gerado pelo mCPP possa ser decorrente da ativação desses receptores, uma vez que o agonista mCPP também têm afinidade pelos receptores 5HT_{2A} (Engel *et al.*, 1996; Hoyer, 1988).

No que diz respeito aos efeitos da 5-HT (experimento 5), nossos resultados reproduziram estudos prévios que já mostraram que a microinjeção desse agonista endógeno promove efeitos do tipo ansiogênico e panicolítico no LTE (Zanoveli *et al.*, 2003; Soares e Zangrossi, 2004). Vale ressaltar que, apesar de se ligar a todos os receptores serotoninérgicos, a 5-HT possui maior afinidade por receptores 5-HT_{2C} (K_i = 5,7 nmol) do que por 5-HT_{2A} (K_i = 16,2 nmol; Knight *et al.*, 2004).

Confirmando o envolvimento dos receptores 5-HT_{2C} nos efeitos observados no LTE após a injeção de 5-HT na SCPD, vimos que o antagonista para esses receptores SB-242084 bloqueia o efeito ansiogênico observado na esQUIVA inibitória. Já na resposta de fuga, embora a injeção de SB-242084 previamente à 5-HT tenha diminuído a latência de saída de um dos braços abertos, essa diminuição não foi estatisticamente significativa. Ainda que o antagonista SB-242084 possua maior afinidade (cerca de 120 vezes) para receptores 5-HT_{2C} (K_i = 8,15 nmol) do que para receptores 5-HT_{2A} (K_i = 851,14 nmol; Knight *et al.*, 2004), é passível de consideração a hipótese de que ao se ligar a esses

receptores, esse antagonista pode ter promovido a atenuação do efeito panicolítico da 5-HT. Isto estaria de acordo com estudos prévios que já demonstraram que os receptores 5-HT_{2A} participam da regulação da resposta de fuga (Soares e Zangrossi, 2004).

Em conjunto, nossos resultados estendem a importância dos receptores 5-HT_{2C} na regulação de comportamentos defensivos associados ao TAG para uma outra estrutura, a SCPD. Além disso, estudos anteriores já mostraram o envolvimento desses receptores na modulação de respostas de defesa associadas à ansiedade a partir de análises em outras estruturas encefálicas.

Recentemente, estudos em nosso laboratório mostraram que os receptores 5-HT_{2C} do núcleo basolateral do complexo amigdalóide também participam da modulação de respostas defensivas como a esQUIVA inibitória, uma vez que a administração de 5-HT ou de MK-212 nesta estrutura promoveu efeito do tipo ansiogênico no LTE e tal efeito foi bloqueado pela microinjeção prévia do antagonista SB-242084. Curiosamente, no núcleo basolateral do complexo amigdalóide, o SB-242084 antagonizou o efeito da 5-HT com uma dose 1000 vezes menor (Vicente, 2009) que a utilizada no presente trabalho para prevenir o efeito ansiogênico gerado pela injeção de 5-HT na SCPD. Além disso, a injeção do antagonista SB-242084 no núcleo basolateral do complexo amigdalóide promoveu efeito do tipo ansiolítico (Vicente, 2009), enquanto que na SCPD, as mesmas doses não promoveram qualquer efeito sobre as respostas medidas no LTE. O efeito ansiolítico do SB-242084 pode ser decorrente da inibição de uma possível estimulação tônica dos receptores 5-HT_{2C} do núcleo basolateral do complexo amigdalóide pela 5-HT. Por outro lado, é passível de consideração a hipótese de que o bloqueio desses receptores altera a atividade constitutiva que eles podem desempenhar nessa estrutura. Essa atividade constitutiva é caracterizada pela ativação do receptor através de mecanismos intra-celulares, sem que haja a ligação com um agonista (Aloyo *et al.*, 2009). É interessante notar que,

como na SCPD, os receptores 5-HT_{2C} localizados no núcleo basolateral do complexo amigdalóide também não participam da regulação da resposta de fuga.

Em suma, o presente trabalho revela que os receptores 5-HT_{2C} da SCPD apresentam papel diferenciado na modulação de comportamentos defensivos relacionados ao TAG e ao TP. Nossos resultados confirmam a participação desses receptores na modulação de respostas associadas à ansiedade, mas não ao pânico, visto que a ativação desses receptores gera efeito ansiogênico na esquiva inibitória, mas não altera a resposta de fuga medida no LTE nem o comportamento de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos com a administração intra-SCPD de agonistas e antagonistas de receptores do tipo 5-HT_{2C} podemos concluir que:

- os receptores 5-HT_{2C} da SCPD participam preferencialmente das respostas associadas ao TAG e não ao TP, uma vez que a resposta de esquiva inibitória associada à ansiedade é facilitada pela ativação desses receptores, enquanto que as respostas de fuga evocadas tanto no LTE como na estimulação elétrica da SCPD não são alteradas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOYO, V.J.; BERG, K.A.; SPAMPINATO, U.; CLARKE, W.P.; HARVEY, J.A. Current status of inverse agonism at serotonin 2A (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacol Ther*, 121: 160-173, 2009.

ALVES, S.H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A.P. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT(2C) agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol*, 15: 37-43, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 3th ed., Washington DC: APA Press, text revision, 1980.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th ed., Washington DC: APA Press, text revision, 2000.

AUDI, E.A.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F G. Mediation by serotonin of the antiaversive effect of zimelidine and propranolol injected into the dorsal midbrain central grey. *J. Psychopharmacology*, 2: 26-32, 1988.

AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe. *J Comp Neurol*, 179: 641-668, 1978.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Introduction: emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press, 1991, p. 1-8.

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

BANDLER, R.; SHIPLEY M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci*, 17: 379-389, 1994.

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

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, 39: 43-68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredador defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*, 103: 70-82, 1989.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G. BLANCHARD, R.J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol*, 463: 97-116, 2003.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res*, 58: 155-165, 1993.

BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N.C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev*, 18: 339-346, 1994.

CAMPBELL, B.M.; MERCHANT, K.M. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res*, 993: 1-9, 2003.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res*, 58: 27-47, 1993.

CASAROTTO, P. C.; DE BORTOLI, V. C.; DE AGUIAR CORRÊA, F. M.; MORAES RESSTEL, L. B.; ZANGROSSI Jr., H. Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *Int J Neuropsychopharmacol*, 5:1-10, 2010.

CLEMETT, D. A.; PUNHANI, T.; DUXON, M. S.; BLACKBURN, T. P.; FONE, K. C. F. Immunohistochemical localisation of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacol*, 39: 123-132, 2000.

DARWIN, C. R. *The expression of the emotions in man and animals*. Londres: John Murray, 1872.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci*, 15: 353-375, 1992.

DE MELLO CRUZ, A.P.; PINHEIRO, G.; ALVES, S.H.; FERREIRA, G.; MENDES, M.; FARIA, L.; MACEDO, C.E.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 182(3): 345-354, 2005.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol*, 5: 305-315, 1991.

ENGEL, G.; GOTHERT, M.; HOYER, D.; SCHLIEKER, E.; HILLEBRAND, K. Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) auto-receptors in the rat brain cortex with 5-HT_{1B} binding sites. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 332: 1-7, 1986.

ENGLANDER, M.T.; DULAWA, S.C.; BHANSALI, P.; SCHMAUSS, C. How stress and fluoxetine modulate serotonin 2C receptor pre-mRNA editing. *J Neurosci*, 25: 648-651, 2005.

FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *J Physiol*, 145: 251-265, 1959.

FINGER, S. Theories of emotion from Democritus to William James. In: FINGER, S. (ed). *Origins of Neuroscience – a history of explorations into brain function*. New York, Oxford University Press, 1994.

GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of “conflict” behavior. *Eur J Pharmacol*, 9: 319-324, 1970.

GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia*, 1: 4282-492, 1960.

GIORGETTI, M.; TECOTT, L. Contributions of 5-HT_{2C} receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur J Pharmacol*, 488: 1-9, 2004.

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense system. *Braz J Med Biol Res*, 14: 239-265, 1981.

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS G.D.; ROTH, M.; NOYES, R. *Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety*. Elsevier Science Publishers, 3: 307-354, 1990.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 27: 811–829, 1994.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: Graeff, F.G.; Brandão, M.L. (eds). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5^a ed., São Paulo Lemos, 1999.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 163: 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*, 28: 239-259, 2004.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu, 1999.

GRAEFF, F.G.; NETO, C.F.; ZANGROSSI Jr., H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 237-246, 1998.

GRAEFF, F.G.; SHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther*, 173: 277-283, 1970.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; OLIVEIRA, R.M. Role of amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res*, 58: 123-131, 1993a.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res*, 26: 67-70, 1993b.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 21: 791-799, 1997.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI Jr., H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H.; den BOER, J.A.; WESTENBERG, H. and WILLNER, P. (eds.) *Textbook of biological psychiatry*. Londres: Wiley and Sons, 879-893, 2002.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hipocampal system. 2nd ed., Oxford: Oxford University Press, 2000.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther*, 65(3): 319-395, 1995.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT₂ receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacol*, 36: 793-802, 1997.

GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; De AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* (Berl), 103: 91-94, 1991.

GUREVICH, I.; ENGLANDER, M.T.; ADLERSBERG, M.; SIEGAL, N.B.; SCHMAUSS, C. Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J Neurosci*, 22(24): 10529-10532, 2002a.

GUREVICH, I.; TAMIR, H.; ARANGO, V.; DWORK, A.; MANN, J.J.; SCHMAUSS, C. Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron*, 43: 349-356, 2002b.

HESS, W.; BRUGGER, M. Das subkortikale Zentrum der affectiven Abwerreation. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 1: 33-52, 1943.

HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepines and serotonergic effects on punished responding but not discrimination. *Psychopharmacology*, 92: 491-504, 1987.

HOYER, D. Functional correlates of serotonin 5-HT₁, recognition sites. *J. Recep. Res.* 8: 59-81, 1988.

HUNSPERGER, R.W. Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 14: 70-92, 1956.

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MARTIN, J. R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res*, 57: 181-191, 1995.

JOHNSON, M.R.; LYDIARD, R.B.; BALLENGER, J.C. Panic disorder: pathophysiology and drug treatment. *Drugs*, 49: 328-344, 1995.

KAHN, R.S.; WETZELER, S. m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function. *Biol Psychiatry*, 30: 1139-1166, 1991.

KENNETT, G.A. 5-HT_{1C} receptors and their therapeutic relevance. *Curr Opin Invest Drugs*, 2: 317-362, 1993.

KENNETT, G.A.; WHITTON, P.; SHAH, P.; CURZON, G. Anxiogenic-like effects for mCPP and TFMPP in animal models are opposed by 5HT-1C receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 164: 445-454, 1989.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol. Behav*, 15: 47-53, 1975.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M.; GERMAN, D. C. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Res*, 155: 331-342, 1978.

KLEIN, D. Delineation of two drugs responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacologia*, 5: 397-408, 1964.

KLEIN, D. Anxiety reconceptualized. *Compr Psychiatry*, 21: 411-427, 1980.

KLEIN, D.; FINK, M. Psychiatric reactions patterns to imipramine. *Am J Psychiatry*, 119: 432-438, 1962.

KNIGHT, A.R.; MISRA, A.; QUIRK, K.; BENWELL, K.; REVELL, D.; KENNETT, G.; BICKERDIKE, M. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 370(2): 114-23, 2004.

LEGGIO, G. M.; CATHALA, A.; MOISON, D.; CUNNINGHAM, K. A.; PIAZZA, P. V.; SPAMPINATO, U. Serotonin 2C receptors in the medial prefrontal cortex facilitate cocaine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacol*, 30: 1-7, 2008.

LOVICK, T.A. Panic disorder – a malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter. *Neuroscientist*, 6: 48-59, 2000.

MARSEILLAN, R.F. A solid state sine-wave stimulator. *Physiol Behav*, 19: 339-340, 1977.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 70: 83-244, 2003.

MILLAN, M.J. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Pharmacologie*, 60: 441-460, 2005.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 48: 254-260, 1955

NASHOLD Jr., B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg*, 30: 14-24, 1969.

NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. The midbrain and pain. In: BONICA, J.J. (ed.). *Advances in neurology*. v. 4. New York: Raven Press, 1974.

NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. 5-HT mediation of the antiaversive effect of isamoltane injected into the dorsal periaqueductal grey. *Behav Pharmacol*, 2: 73-77, 1991.

NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT Receptor Subtypes in the Modulation of Dorsal Periaqueductal Gray Generated Aversion. *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 1-6, 1995.

NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. RODGERS, R.J.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res*, 187: 72-79, 2008.

OLDS, M.E.; OLDS, J. Approach-escape interactions in rat brain. *Am J Physiol*, 203: 803-810, 1962.

PANKSEPP, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. In: BURROWS G.D.; ROTH, M.; NOYES, R. *Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 3: 307-354, 1990.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed., San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.

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

PEREIRA, M.E.C. O conceito de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Atheneu, 2004 , p 3-28.

PETERSEN, E.N.; SCHEEL-KRUGER, J. Anconflict effects of 5-HT antagonists by intra amygdaloid injection. In: 14th CINF Congress Abstracts, 1984, p.399.

PINHEIRO, R. L. H.; DEL-BEM, C. M.; ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *J Psychopharmacol*, 22: 132-137, 2008.

POBBE, R.L.H.; ZANGROSSI Jr., H. 5HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)*, 183: 314-324, 2005.

POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI Jr., H.; VIANA, M.B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*, 147: 185-198, 2003.

PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther*, 55: 149-181, 1992.

QUIRK, K.; LAWRENCE, A.; JONES, J.; MISRA, A.; HARVEY, V.; LAMB, H.; REVELL, D.; PORTER, R.H.P.; KNIGHT, A.R. Characterisation of agonist binding on human 5-HT_{2C} receptor isoforms. *Eur J Pharmacol*, 419: 107-112, 2001.

ROBICHAUD, R.C.; SLEDGE, K.L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life Sci*, 8: 965-969, 1969.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRE, E. C.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev*, 25: 647-659, 2001.

SCHENBERG, L.C.; GRAEFF, F.G. Role of periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 9: 287-295, 1978.

SCHUTZ, M.T.B.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology*, 85: 340-345, 1985.

SOARES, V.P.; ZANGROSSI Jr., H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull*, 64: 181-8, 2004.

STAHL, S.M.; GERGEL, I.; LI, D. Escitalopram in the treatment of panic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*, 64: 1322-1327, 2003.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 65: 571-576, 2000.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 44(2): 463-469, 1993.

TYE, N.C.; EVERITT, B.J.; IVERSEN, S.D. 5-Hydroxytryptamine and punishment. *Nature*, 268: 741-743, 1977.

VERTES, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 313: 643-668, 1991.

VIANA, M.B.; GRAEFF, F.G.; LOSCHMANN, P.A. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*, 58: 167-172, 1997.

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 549-554, 1994.

VICENTE, M.A. *Papel dos receptores do tipo 5-HT_{2C} do núcleo basolateral do complexo amigdalóide de ratos na modulação de comportamentos defensivos associados à ansiedade ao pânico*. Ribeirão Preto: usp, 2009, 85p. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

WERRY, T.D.; LOIACONO, R.; SEXTON, P.M.; CHRISTOPOULOS, A. RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signaling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther*, 119: 7-23, 2008.

WISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, 177: 180-183, 1972.

YOUNG, R.F. Brain and spinal stimulation: how and to Whom! *Clin Neurosurg*, 35: 429-447, 1989.

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

ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F.G.; Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 55-73.

ZANGROSSI Jr., H.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.H.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, 25: 637-645, 2001.

ZANOVELI, J.M.; NETTO, C.F.; GUIMARÃES, F.S.; ZANGROSSI Jr., H. Systemic and intra-dorsal periaqueductal gray injections of cholecystinin sulfated octapeptide (CCK-

8s) induce a panic-like response in rats submitted to the elevated T-maze. *Peptides*, 25: 1935-1941, 2004.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol*, 25: 153-161, 2003.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI Jr., H. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol*, 16:543-52, 2005

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)