

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Farmacologia

Efeito panicolítico de agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral: papel da neurotransmissão GABAérgica

Thatiane de Oliveira Sergio

Ribeirão Preto – SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Thatiane de Oliveira Sergio

Efeito panicolítico de agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral: papel da neurotransmissão GABAérgica

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

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sergio, Thatiane de Oliveira

Efeito panicólfico de agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral: papel da neurotransmissão GABAérgica. Ribeirão Preto, 2010.

65p.:il.:30cm

Dissertação de mestrado, apresentada a faculdade de medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Zangrossi Junior, Hélio.

1. Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral;
2. Pânico;
3. Serotonina;
4. GABA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thatiane de Oliveira Sergio

Efeito panicolítico de agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral: papel da neurotransmissão GABAérgica

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

Profº Dr.: Hélio Zangrossi Junior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura _____

Profº Dr.: Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP-USP

Assinatura _____

Profª Dr.: Milena de Barros Viana

Instituição: UNIFESP

Assinatura _____

Aos meus pais, Geraldo e Leontina,
dedico esse trabalho com a mais profunda
admiração e respeito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Hélio Zangrossi Júnior pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelo empenho demonstrado como meu orientador.

Aos membros da banca examinadora Prof Dr Francisco Silveira Guimarães e Prof Dra.: Milena de Barros Viana pela prontidão na leitura da próforma e pelas sugestões pertinentes.

À Prof Dra Telma Gonçalves Carneira Spera de Andrade e a Dra Viviane Avanzi pelos preciosos ensinamentos durante a iniciação científica.

Ao querido Afonso pela excelente colaboração técnica e pela paciência e carinho que teve comigo nos momentos, em que literalmente, eu quebrava tudo.

À Soninha, Fátima e ao Ramon pela atenção e paciência.

Aos funcionários da CPG da FMRP, pela prontidão e atenção de sempre.

Às funcionárias do biotério Maria Inês Nemoto e Eliana Barros, pelo cuidado dispensado aos animais. Obrigada também aos ratinhos, sem os quais este trabalho não teria se realizado.

À CAPES pelo suporte financeiro

Minha mais profunda gratidão...

À amada mamãe meu maior exemplo de vida e ao inesquecível papai, que mesmo de longe está a compartilhar isso comigo. Aos irmãos Kátia, Wagner e Simone pelo carinho e preocupação com a irmãzinha mais nova. Aos queridinhos sobrinhos Bruno, Carol, Júlia e Gabi. Ao cunhado Cláudio pela serenidade e disposição em sempre ajudar. Ao “pequenino” e carinhoso Théo.

À minha família de Ribeirão Preto: Elidiane por sua inestimável amizade e companhia sempre agradável e pela confiança em morar com alguém que não lembra nem o próprio endereço. A Alline (Doida) pelos momentos bons que passamos juntos e por tantos outros que certamente virão. E como não poderia deixar de lembrar (né meninas!!!) ao Tinoco.

A Paula minha amiga que dividiu comigo tantas angústias e felicidades. Obrigada pela companhia nas eternas tardes de sábado e domingo fazendo quimitrodos ou estimulação elétrica.

Aos amigos de laboratório: Danão, Ailton, Marcelzinho, Val, Dri, Plínio, Vanessa e Roger pela alegre convivência.

Aos amigos de graduação: Anelisa, Vandeco, Rafa, Carioca e Ligiana. Foram inesquecíveis os anos que passamos juntos. Aos velhos amigos: Karina, Gustavo, Kelly (Ervilha), Jana, Lu Quelônio e Lu (Perturbado) agradeço pela torcida de vocês. E aos que tornam a vida de pós-graduando em Ribeirão mais serena e divertida, em especial: Marcinho, Luis, Flávio e Deives

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Ansiedade e medo	15
1.2. Transtorno do Pânico.....	16
1.3. A Substância Cinzenta Periaquedutal e sua relação com o pânico.....	19
1.4. Validação da estimulação elétrica da SCPD como modelo de pânico.....	22
1.5. Papel da serotonina na modulação das respostas defensivas relacionadas à SCPD.....	23
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Animais	31
3.2. Drogas	31
3.3. Quimitrodo	32
3.4. Aparatos Experimentais.....	32
3.4.1. Arena para estimulação elétrica	32
3.5. Procedimentos Experimentais:	33
3.5.1. Cirurgia para implantação do quimitrodo.....	33
3.5.2. Testes Comportamentais	34
3.6. Perfusão	37
3.7. Histologia	38
3.8. Análise dos resultados.....	38
4. RESULTADOS.....	39
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO	64

RESUMO

A Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPD) tem sido relacionada com a mediação do comportamento defensivo. A estimulação elétrica desta estrutura mesencefálica evoca reações de fuga acompanhada por mudanças neurovegetativas, que têm sido associadas a ataques de pânico. Vários estudos indicam que a serotonina (5-HT) inibe a aversão gerada pela estimulação da SCPD e que os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} modulem o efeito do tipo panicolítico da serotonina nesta estrutura. Curiosamente, as respostas celulares promovidas por esses receptores são opostas, enquanto a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} promove respostas celulares excitatórias a ativação de receptores 5-HT_{1A} evoca respostas inibitórias. Desta forma, sugere-se que o efeito antiaversivo decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} seja mediado pela ativação de interneurônios GABAérgicos na SCPD. No presente trabalho, verificamos se o efeito antiaversivo decorrente da administração de agonistas de receptores do tipo 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na porção dorsolateral da SCPD é decorrente da facilitação da neurotransmissão GABAérgica nesta mesma estrutura encefálica. Nossos resultados mostram que a administração prévia intra-SCPdl do antagonista de receptores GABA_A bicuculina bloqueou o efeito promovido pela injeção intra-SCPdl do agonista endógeno 5-HT, do agonista de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI, do agonista não seletivo de receptores do tipo 5-HT_{2C} mCPP e do agonista de receptores do tipo 5-HT_{2C} RO 60-0175. No entanto, o antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2C}, SB-242084 não bloqueou a resposta promovida pelo RO 60-0175. Além disso, a administração prévia do antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2A}, quetanserina bloqueou o efeito do DOI, mCPP e do RO 60-0175, indicando que tais drogas atuaram através da interação com receptores do tipo 5-HT_{2A}. Em suma, nossos dados mostram que o efeito antiaversivo promovido pela ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} na SCPdl seja mediado pela facilitação da neurotransmissão GABAérgica.

ABSTRACT

The dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) has been implicated in the mediation of defensive behaviors. Electrical stimulation of this midbrain structure induces escape reaction and autonomic changes, a response that have been associated with panic attacks. Studies indicate that serotonin inhibits the aversion generated by the stimulation of dPAG and both 5-HT_{1A} and 5HT_{2A} receptors are involved in this panicolic-like effect. Curiously, at the molecular level these receptors cause opposite effects, whereas activation of 5-HT_{1A} receptors hyperpolarizes the cell membrane and evokes inhibitory effects, activation of 5-HT_{2A} receptors promotes excitatory effects. It has been proposed that 5-HT_{2A} receptor agonists exert their inhibitory effect on escape by activation of GABAergic interneurons located in the dPAG. In the present study we evaluated this hypothesis by investigating whether previous intra-dorsolateral PAG (dIPAG) administration of the GABA_A receptor antagonist bicuculline blocks the anti-escape effect caused by the injection of different 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists into the same brain area. Our results showed that intra-dIPAG administration of 5-HT, the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI, the non-selective 5-HT_{2C} receptor agonist mCPP and the 5-HT_{2C} receptor agonist RO 60-0175 significantly inhibited the escape reaction induced by electrical stimulation of the dIPAG. In all cases this effect was blocked by previous microinjection of bicuculline. The inhibitory effect on escape caused by DOI, RO 60-0175 and mCPP was also blocked by previous intra-dIPAG injection of the preferential 5-HT_{2A} receptor antagonist ketanserin. Previous injection of the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 in the dIPAG did not block the anti-escape effect of RO 60-0175. These later results are indicative that DOI, RO 60-0175 and mCPP impaired escape by primarily interacting with 5-HT_{2A} receptors in the dIPAG. Taken together our data support the proposal that the anti-escape effect promoted by the activation of 5-HT_{2A} receptors in the dIPAG is mediated by local facilitation of GABA neurotransmission.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade e medo

A ansiedade, assim como o medo, o amor, o ódio, a alegria e a tristeza são emoções por nós experimentadas ao longo de toda a vida. Tanto a ansiedade como o medo possuem funções adaptativas que, quando vivenciadas em contextos e em níveis apropriados, auxiliam o indivíduo no recrutamento de respostas comportamentais adequadas e asseguram assim a sua sobrevivência (Pratt, 1992; Graeff, 1994, 1999).

No entanto, o medo e a ansiedade podem se manifestar em intensidade variável, passando de um desconforto para uma sensação intensa de terror. Quando presente em níveis maiores do que aqueles considerados normais e benéficos, a ansiedade passa a ser inconveniente, e o desempenho do indivíduo é prejudicado por alterações comportamentais (alerta e agitação excessivos) e fisiológicas (tensão muscular, problemas digestivos, distúrbios do sono com conseqüente fadiga e doenças psicossomáticas) exacerbadas (Graeff & Hetem, 2004). Quando patológica, a ansiedade pode ser a única manifestação do quadro clínico, sendo assim considerada primária, ou pode estar associada a outras doenças, de natureza psiquiátrica ou não.

Os transtornos de ansiedade considerados primários foram classificados pela Associação Psiquiátrica Americana (APA) e descritos, na versão mais recente, do Manual de Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais, (DSM-IV-RT, 2000) em: Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno do Pânico com e sem Agorafobia, Agorafobia sem histórico de Transtorno do Pânico, Transtorno Obsessivo-Compulsivo, Fobia Específica, Fobia Social, Transtorno de Estresse Pós-Traumático, Transtorno de Estresse Agudo, Transtorno de Ansiedade devido a uma condição médica geral, Transtorno de Ansiedade induzido por substâncias, Transtorno de Ansiedade sem outra especificação.

Embora progressos significativos tenham sido obtidos nas últimas décadas em relação à neurobiologia da ansiedade e ao tratamento de seus transtornos, muitas são as questões a serem investigadas. Além disso, os tratamentos farmacológicos existentes nem sempre são eficazes e apresentam efeitos adversos que podem ser inadequados para determinados pacientes (Graeff, 1994, 1999). Dentre as abordagens existentes para investigar tais problemas, os modelos experimentais de ansiedade, tanto clínicos como aqueles que envolvem experimentação animal, são de grande utilidade.

A correlação das emoções humanas com as respostas comportamentais emitidas pelos animais baseia-se nos estudos pioneiros realizados por Charles Darwin e apresentados em seu livro “A expressão das emoções nos homens e nos animais”, publicado em 1872. Com base na similaridade observada entre alguns comportamentos humanos e de outros animais, o naturalista sugeriu que além de características físicas, o ser humano também herdaria características comportamentais dos animais (apud Graeff, 1994; Panksepp, 1982). Sob esta perspectiva evolutiva, estados emocionais de ansiedade e medo experimentados pelos seres humanos teriam raízes filogenéticas nas reações defensivas que os animais apresentam frente a estímulos representativos de ameaça a sua integridade física, bem estar e sobrevivência (Panksepp, 1982; Graeff, 1994; Hofer, 1995; Stein & Bouwer, 1997).

1.2. Transtorno do Pânico

As primeiras descrições do quadro nosológico hoje classificado como transtorno do pânico foram realizadas por Jacob Mendes da Costa, durante a guerra civil americana (1871). Este médico descreveu um quadro observado em soldados, que passou a ser conhecido como “síndrome do coração irritável” ou “síndrome

DaCosta”, caracterizado por dor torácica intensa, palpitações e outros sintomas cardíacos, sem a presença de lesões estruturais identificáveis (Fyer et al.,1995).

Alguns anos depois, Freud (1895, apud Pereira, 2004) descreveu uma síndrome denominada de neurose da angústia, caracterizada por “irritabilidade geral, expectativa angustiada, ataques de angústia, vertigem e parestesias”. Freud propôs que a neurose da angústia poderia ser apresentada sob duas formas: como um estado crônico de ansiedade e como ataques de ansiedade. Embora ele tenha detectado essas duas formas da neurose da angústia, Freud não as considerou como distintas, mas sim como variantes de uma mesma síndrome.

Em 1980, na terceira edição do DSM, a APA adotou a distinção entre o transtorno do pânico e o transtorno de ansiedade generalizada. Tal distinção foi baseada em uma série de trabalhos realizados por Donald Klein (1962, 1964, 1980) sobre as ações terapêuticas da imipramina. Nestes estudos os autores relatam que nos casos de neurose da angústia, em que predominam os ataques da ansiedade, a resposta a imipramina era mais positiva e o tratamento com os tranquilizantes habituais mostrava-se pouco eficaz. Por outro lado, nos casos em que a sintomatologia era caracterizada por um estado de angústia crônica e flutuante, sem a presença de ataques recorrentes, não havia benefício considerável com o uso da imipramina e o tratamento convencional, com benzodiazepínicos, obtinha melhor resultado. Essa dissociação farmacológica levou Klein a propor que a ansiedade do tipo “pânico” era qualitativamente diferente da ansiedade “não pânico”.

O transtorno do pânico de acordo com a mais recente classificação do DSM é caracterizado pela recorrência de ataques de pânico inesperados, que são acompanhados por mudanças significativas no comportamento do indivíduo e por

preocupações persistentes por parte deste quanto à ocorrência, às implicações e às conseqüências de outros ataques (DSM-IV-RT, 2000).

Por sua vez, o ataque de pânico é caracterizado como um período distinto de intenso temor ou desconforto, um estado de apreensão intensa desencadeado subitamente e que está frequentemente associado a sentimentos de falta de controle. Durante esses ataques, estão presentes sintomas tais como palpitações, dor ou desconforto torácico, tremores, náuseas, tonturas, sensação de sufocamento e medo de “ficar louco” ou de morte iminente. Alguns relatos de pacientes, também incluem a resposta de congelamento e o desejo de fuga imediata da situação (Cassano & Savino 1993; Goetz et al., 1994).

Os ataques de pânico também ocorrem em outros transtornos de ansiedade (Transtorno de estresse pós traumático, fobias, entre outros), podendo ser espontâneos ou induzidos pela exposição a objetos fóbicos (insetos, aracnídeos, sangue) ou por situações predisponentes, tais como lugares fechados, altura ou multidões. No entanto, os ataques de pânico situacionais estão relacionados à expectativa do indivíduo de sentir-se ameaçado em determinado local ou contexto, não apresentando qualquer relação com os ataques de pânico espontâneos que constituem o elemento central do transtorno do pânico.

Em geral, em torno de dois terços dos pacientes com transtorno do pânico também desenvolvem agorafobia (DSM-IV-RT, 2000), que é definida como uma ansiedade ou esquiva de locais ou situações, dos quais o auxílio pode não estar disponível no caso de ter um ataque de pânico, ou sintomas do tipo pânico. O transtorno do pânico pode acarretar grandes prejuízos ao paciente, principalmente se estiver acompanhado de agorafobia, limitando as atividades profissionais e sociais do indivíduo.

Estudos epidemiológicos em todo mundo indicam que a prevalência do transtorno do pânico (com ou sem agorafobia) durante toda a vida encontra-se em 1,5% a 3,5% (DSM-IV-RT, 2000). Especificamente, na população brasileira a prevalência do transtorno do pânico, em períodos de seis meses a um ano, é de 0,4% a 2,3% e de até 3,5% ao longo da vida. Esta pequena diferença entre períodos discretos e a prevalência ao longo da vida sugere uma tendência a cronicidade desta condição clínica (Bernik., 2001)

1.3. A Substância Cinzenta Periaquedutal e sua relação com o pânico

Diferentes estruturas cerebrais que modulam as reações de defesa e representam os substratos neurais do medo e da ansiedade têm sido implicadas no transtorno do pânico. Várias evidências ressaltam a importância da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) como uma estrutura chave na gênese do transtorno do pânico (para revisão ver Graeff 2002, 2003, Del-Ben & Graeff, 2009).

A SCP é uma estrutura mesencefálica longitudinalmente organizada, que contorna o aqueduto cerebral até a comissura posterior, onde margeia o terceiro ventrículo no diencefalo. Anatômica e funcionalmente, a SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais denominadas dorsolateral, dorsomedial, lateral e ventrolateral (Bandler & Shipley, 1994). Estudos recentes sugerem que as diversas funções atribuídas a SCP sejam integradas diferencialmente pelas colunas neuronais longitudinais que se estendem ao longo do eixo rostrocaudal (Bandler et al., 2000).

A SCP faz parte do chamado sistema cerebral de defesa, que inclui também estruturas como o complexo amigdalóide e o hipotálamo medial (Graeff., 2003). As primeiras associações entre a estimulação elétrica destas áreas com a geração de

reações defensivas partem dos estudos pioneiros de Walter Rudolf Hess (1943, apud Schenberg., 2001), mostrando que a estimulação elétrica de áreas subcorticais eliciavam respostas defensivas. Neste trabalho, os autores relatam que a estimulação elétrica do hipotálamo medial de gatos desencadeava reações de defesa bem estruturadas do tipo luta e fuga. Como este quadro se assemelha ao verificado quando o animal é ameaçado por um predador, Hess o denominou de “reação de defesa afetiva”.

Posteriormente, os estudos de Fernandez de Molina e Hunsperger (1959) estenderam os achados de Hess e mostraram que a estimulação elétrica de outras estruturas, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e o complexo amigdalóide, também provocavam mudanças comportamentais e autonômicas semelhantes à estimulação do hipotálamo medial.

De interesse para o presente trabalho, a estimulação da SCP promove reações de fuga com saltos não direcionados, que são alternados com períodos de congelamento (Schmitt P., et al 1986), acompanhados por manifestações neurovegetativas como midríase, piloereção, micção, defecação, hiperventilação, e aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Tais reações defensivas, promovidas pela estimulação da SCP mais especificamente de sua porção dorsal (SCPD), que compreende as colunas dorsolateral e dorsomedial, são similares àquelas evocadas por situações naturais de perigo como no confronto com o predador (para revisão ver Graeff, 2003).

Neste sentido, um estudo recente de Mobbs e colaboradores (2009) ilustra a relação da SCP na modulação das respostas defensivas frente a perigos proximais. Neste estudo, os autores avaliaram através de neuroimagem os efeitos da ativação cerebral em seres humanos apresentados a um predador virtual. Desta forma,

voluntários sadios poderiam controlar os movimentos de uma presa virtual (representado como um ponto) em um labirinto afim de evitar o contato com um predador virtual (representado por um triângulo). No caso em que o predador capturasse a presa choques elétricos, eram aplicados ao dedo do participante. Os autores observaram, que quando o predador estava longe da presa estruturas como o córtex pré-frontal e o núcleo lateral do complexo amigdalóide eram ativados. Já quando o predador estava mais próximo da presa o núcleo central do complexo amigdalóide e a SCP eram ativados. Tais resultados reforçam o papel da SCP nas reações evocadas por situações naturais de perigo relacionadas com o pânico.

Diversas evidências sugerem que exista similaridade entre as reações defensivas evocadas pela estimulação elétrica da SCPD e os ataques de pânico (para revisão ver Schenberg, 2001). Nesta direção, Nashold e colaboradores (1969, 1974) relataram que, em humanos, a estimulação elétrica de áreas mesencefálicas dorsais desencadeava fortes sensações desagradáveis, como medo, pavor, ansiedade intensa e sensação de morte eminente, além de alterações fisiológicas como dor torácica profunda, taquicardia, dispnéia, sensação de calor ou frio e urgência de micção. Tais respostas são evocadas pela estimulação de baixa intensidade da porção dorsal, mas não da ventral, da SCP. Adicionalmente, estudos de tomografia por emissão de pósitrons (PET), realizados também em humanos, demonstraram que o complexo amigdalóide e o teto mesencefálico, que inclui a SCPD, e as camadas profundas do colículo superior, são ativados durante ataques de pânico induzidos em voluntários sadios pela infusão de lactato de sódio (Reimam et al., 1989).

1.4. Validação da estimulação elétrica da SCPD como modelo de pânico

Apesar das respostas defensivas induzidas na SCPD terem sido originalmente tomadas como um modelo de ansiedade em procedimentos de condicionamento operante (Graeff et al., 1988; Schenberg & Graeff, 1978; Schenberg et al 2001), a partir da proposição original do psiquiatra Valentil Gentil em 1988, a associação das mesmas com os ataques de pânico passou a ser explorada (Gentil, 1988).

Dentro desta perspectiva, Jenck e colaboradores (1995), utilizando a estimulação elétrica da SCPD em uma caixa vai-e-vem (Shuttle-box), observaram que a administração sistêmica de drogas que atenuam os ataques de pânico como o alprazolam e o clonazepam eram capazes, de maneira dose-dependente, de reduzir a aversão induzida pela estimulação elétrica desta estrutura. Por outro lado, drogas que induzem ataques de pânico, como a ioimbina e a cafeína, aumentavam a aversão provocada pela estimulação da SCPD.

Já nos trabalhos realizados por Schenberg e colaboradores (2001) as reações defensivas eliciadas pela estimulação elétrica são aferidas em uma arena circular. Os autores relatam uma seqüência de mudanças comportamentais e neurovegetativas desencadeadas com o aumento gradual da frequência de estimulação elétrica. Tais comportamentos incluem: imobilidade, corrida, saltos, exoftalmia, micção e defecação. As análises farmacológicas indicam que a corrida e os saltos são as respostas defensivas preferencialmente afetadas por drogas que atuam no pânico.

Mais precisamente, tem sido observado que a frequência de estimulação elétrica para eliciar estas respostas é aumentada pela administração crônica, mas não pela aguda, de drogas panicolíticas como a clomipramina e a fluoxetina. Por

outro lado, a administração crônica dos ansiolíticos diazepam e buspirona, bem como do inibidor seletivo de recaptação de noradrenalina, maprotilina, é ineficaz. Além disso, foi observado que a droga panicogênica pentilenotetrazol (PTZ) reduz a frequência para eliciar a fuga.

De maneira interessante, em relação ao substrato neuroquímico as drogas por eles empregadas atuam primariamente por mecanismos farmacológicos distintos, sugerindo que diferentes sistemas de neurotransmissores/ neuromoduladores possam atuar sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação da SCPD. Dentre os neurotransmissores/neuromoduladores envolvidos estão a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), o ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato e a colecistocinina (Nutt & George, 1990; Guimarães et al.,1991; Graeff 1994, 2002, 2003; Brandão et al., 1994; Teixeira & Carobrez.,1999; Zanoveli et al., 2003, 2004).

A observação de que drogas que modulam a neurotransmissão serotoninérgica como os antidepressivos tricíclicos e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina são eficazes no tratamento do transtorno do pânico, propiciou o desenvolvimento de hipóteses de que o sistema serotoninérgico estaria fortemente envolvido na fisiopatogenia deste transtorno (para revisão ver Graeff 2002,2003).

1.5. Papel da serotonina na modulação das respostas defensivas relacionadas à SCPD

Os primeiros estudos que buscaram elucidar a função da serotonina na mediação dos comportamentos defensivos relacionados à SCPD foram realizados por Kiser & Lebovitz (1975). Os autores relataram que comportamento de pressionar uma alavanca para reduzir ou finalizar a estimulação elétrica aplicada na SCPD de

ratos é facilitado pela administração sistêmica de drogas que inibem a neurotransmissão serotoninérgica, como o para-cloro-fenilalanina (p-CPA), que atua como inibidor da síntese de serotonina e por antagonistas não seletivos de receptores serotoninérgicos, como a ciproheptadina (Kiser & Lebovitz., 1975; Kiser et al., 1978). De maneira oposta, a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica, causada pela administração sistêmica do precursor da síntese de serotonina 5-hidroxitriptofano e do inibidor de recaptação de serotonina clomipramina, inibia o comportamento dos animais para cessar o estímulo na SCPD (Kiser et al., 1978).

Neste contexto, é interessante ressaltar que o aumento da liberação de serotonina causada pela estimulação elétrica do núcleo dorsal da rafe, que envia projeções serotoninérgicas para várias estruturas prosencefálicas e mesencefálicas, dentre elas a SCP (Vertes, 1991), promoveu respostas semelhantes à administração de drogas que causavam aumento na neurotransmissão serotoninérgica (Kiser et al., 1980).

Ademais, Jenck e colaboradores (1989), empregando a estimulação elétrica da SCPD em uma caixa vai-e-vem, relataram que a administração sistêmica do agonista não seletivo para receptor do tipo 5-HT_{2C} mCPP e do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI inibiam a resposta de fuga. Por outro lado, a administração sistêmica do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT tinha efeito oposto (Jenk et al., 1989, 1990).

Com a introdução de técnicas que permitiam a análise do efeito de drogas injetadas diretamente na SCPD, em 1981, Brandão e colaboradores demonstraram que a microinjeção de serotonina diretamente na SCPD promovia um efeito inibitório sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica desta estrutura. Posteriormente, Schutz e colaboradores (1985) também observaram que a injeção

intra-SCPD de serotonina e do agonista não seletivo de receptores serotoninérgicos, o 5-metoxi-N,N- dimetilriptamina(5-MeODMT), aumentava o limiar de corrente elétrica que, aplicada a SCPD, era capaz de induzir o comportamento de fuga. Além disso, os pesquisadores observaram que este efeito inibitório dos agonistas sobre a fuga era bloqueado pelo pré-tratamento local com o antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos metergolina, ou com o antagonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} quetanserina, implicando a participação dos receptores do tipo 5-HT_{2A} na regulação da resposta de fuga.

Mais tarde, Nogueira & Graeff (1995) demonstraram que a injeção intra-SCPD do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI aumentava o limiar de estimulação elétrica da SCPD para induzir resposta de fuga. Este efeito antiaversivo do DOI foi bloqueado pela injeção prévia intra-SCPD do antagonista de receptores 5-HT_{2A} espiperona. Neste mesmo estudo, um efeito inibitório sobre a resposta de fuga também foi obtido com a injeção intra-SCPD dos agonistas de receptores do tipo 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT e BAY-R-1530. Ambos os agonistas tiveram seus efeitos bloqueados pela administração prévia do antagonista de receptores 5-HT_{1A} NAN-190. Estes resultados levaram a sugestão de que a ativação direta de receptores tanto do tipo 5-HT_{1A} como 5-HT_{2A} poderiam inibir a aversão na SCPD.

Embora os receptores do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} pareçam modular igualmente efeitos antiaversivos na SCPD, o mecanismo de resposta celular dos mesmos são opostos. Enquanto a ativação de receptores do tipo 5-HT_{1A} leva a uma hiperpolarização, causada pelo aumento na permeabilidade de membrana ao K⁺, evocando um efeito inibitório sobre a aversão, a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} promove despolarização, devido a um aumento de Ca²⁺ intracelular, promovendo efeitos excitatórios (Hoyer et al., 2002; Brandão et al., 1991).

Buscando elucidar esta aparente contradição, Nogueira e Graeff (1994) propuseram que a serotonina poderia, em parte, exercer sua ação ativando neurônios inibitórios da SCPD. Em suporte a esta idéia, Griffiths e Lovick (2002) demonstram que aproximadamente mais de 70% dos receptores do tipo 5-HT_{2A} encontram-se localizados em interneurônios GABAérgicos em todas as colunas da SCP, inclusive na SCPD.

Desta forma, se a hipótese de Nogueira e Graeff (1994) estiver correta, a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} poderia excitar os interneurônios GABAérgicos com a consequente liberação de GABA na SCPD. Este efeito seria condizente com evidências da literatura demonstrando que a facilitação da neurotransmissão GABAérgica nesta estrutura mesencefálica inibe a resposta de fuga gerada pela estimulação elétrica da SCPD. Estes resultados foram obtidos tanto após a microinjeção do agonista de receptores do tipo GABA_A muscimol, como também de agonistas de receptores benzodiazepínicos, como o clordiazepóxido e o midazolam (Audi & Graeff, 1984, Graeff et al., 1986). Por outro lado, a administração intra-SCPD de antagonistas de receptores do tipo GABA_A, como a bicuculina, evoca reações defensivas que mimetizam as reações induzidas pela estimulação elétrica desta mesma área encefálica (Brandão et al., 1982, 1986, 1988; DiSclala & Sandnet; 1989) Sendo assim, tais resultados sugerem que, diferentemente da 5-HT, o GABA exerce uma ação inibitória tônica sobre a aversão gerada na SCPD (Brandão et al., 1986, 2005; Graeff 2004).

No presente trabalho, a hipótese de que o efeito antiaversivo resultante da administração intra-SCPD de agonistas serotoninérgicos de receptores 5-HT_{2A} decorra da facilitação da neurotransmissão GABAérgica foi avaliada sobre uma perspectiva comportamental. Mais precisamente, avaliamos se a administração

prévia de bicuculina na porção dorsolateral da SCP (SCPdl) bloqueia a inibição da fuga induzida pela administração do agonista endógeno 5-HT e do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI. Adicionalmente, baseado em evidências da literatura mostrando a co-localização de receptores 5-HT_{2C} sobre neurônios GABAérgicos em diversas áreas cerebrais (Serrats., 2004; Boothmam et al.,2006; Bubar et al., 2007; Liu et al.,2007), verificamos também se o efeito da ativação deste subtipo de receptor pode ser bloqueado pela administração prévia de bicuculina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Testar a hipótese de que o efeito antiaversivo decorrente da administração de agonistas de receptores do tipo 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na SCPdl é mediado pela facilitação da neurotransmissão GABAérgica nesta mesma estrutura encefálica.

2.2. Objetivos Específicos

- **Experimento 1:** verificar o efeito da administração prévia intra-SCPdl do antagonista de receptores GABA_A bicuculina sobre a inibição da fuga promovida pela injeção local do agonista endógeno 5-HT, do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A} DOI, do agonista não seletivo para receptores 5-HT_{2C} mCPP e do agonista de receptores 5-HT_{2C} RO 60-0175 . Para fins comparativos, verificar o efeito da administração prévia de bicuculina sobre a inibição da fuga induzida pela administração do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT.

- **Experimento 2A:** a fim de confirmar se o efeito inibitório gerado pela administração intra-SCPdl do DOI sobre a resposta de fuga é decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A}, verificamos se o antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A} quetanserina é capaz de prevenir tal efeito.

- **Experimento 2B:** a fim de verificar se o efeito inibitório gerado pela administração intra-SCPdl de RO 60-0175 sobre a resposta de fuga é decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2C}, verificamos se o antagonista deste subtipo de receptor, o SB-242084, é capaz de prevenir tal efeito.

- **Experimento 2C:** a fim de investigar se o efeito inibitório gerado pela administração intra-SCPdl de mCPP e RO 60-0175 sobre a resposta de fuga é decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} verificamos se a quetanserina é capaz de prevenir tal efeito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, com peso entre 270-300g no início do experimento, mantidos em grupos de 5, em caixas de acrílico (42 x 24 x 17cm), com livre acesso à água e comida. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório, com ciclo claro-escuro de 12 horas (7:00 às 19:00 horas) e temperatura controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

As análises comportamentais descritas neste trabalho foram realizadas no período entre 13:00 e 19:00 horas.

3.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- **5-HT** (serotonina creatinina sulfato; Sigma, EUA);
- **Cloridrato de DOI** ([1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano], Sigma, EUA);
- **8-OH-DPAT** ([8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin], Sigma, EUA);
- **mCPP** ([1-(3-(clorofenil) piperazina], Sigma, EUA);
- **RO 60-0175** (2-[cloro- 5 flúor- indol 1 metilamina], Tocris, EUA);
- **Quetanserina**(R41468;3-[2-[4-(4-fluorobenzoil)-1-piperidinil]etil]-2,4(1H,3H)-quinazolinadiona tartrato, Sigma, EUA);
- **SB-242084** (6-Chloro-2,3-dihydro-5-methyl-N-[6-[(2-methyl-3-pyridinyl)oxy]-3-pyridinyl]-1H-indole-1-carboxamide dihydrochloride hydrate; Tocris, EUA).
- **Bicuculina Methiodato** (Sigma, EUA).

Com exceção do RO 60-0175, que foi dissolvido em salina com 4% de DMSO, e da quetanserina, que foi dissolvida em salina estéril, contendo Tween 80 a 2%, todas as outras drogas foram dissolvidas em salina estéril a 0,9%.

3.3. Quimitrodo

O quimitrodo consiste de um eletrodo conectado a uma cânula-guia que foi construída a partir de uma agulha hipodérmica comercial, possuindo 13,0 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo. A mesma teve em seu interior um mandril de aço de 0,3 mm de diâmetro e 13,0 mm de comprimento que a manteve desobstruída. Este mandril foi retirado da cânula-guia apenas durante a sessão experimental. O eletrodo, por sua vez, foi confeccionado 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 colado paralelamente à metade distal de uma cânula-guia, ultrapassando-a em 1 mm. A extremidade proximal do eletrodo foi soldada a um pino de aço que juntamente com a extremidade superior da cânula-guia constituem os pólos de estimulação. A estimulação elétrica do tecido cerebral ocorria a partir da secção transversa distal do eletrodo.

3.4. Aparatos Experimentais

3.4.1. Arena para estimulação elétrica

A estimulação elétrica da SCPdl foi realizada em uma arena de acrílico (25,5 cm de diâmetro na base, 40 cm de diâmetro na borda e 36 cm de altura), com serragem em seu assoalho para reproduzir as condições da gaiola-viveiro do animal. Uma tela de *nylon* disposta na parte superior da cuba impedia que os animais saltassem para fora da área de teste durante as sessões de estimulação elétrica. A tela de *nylon* possuía uma abertura em seu centro, que permitia a passagem de um conector elétrico giratório de teflon ligado a dois canais de saídas. A primeira saída

estava ligada a um estimulador, que gerava corrente senoidal de 60 Hz e corrente constante (Marseillan, 1977). A corrente elétrica aplicada era monitorada por meio de um osciloscópio (Pantec – 5205 – 10mHz) ligado em paralelo ao aparelho estimulador. A segunda saída era conectada a um cabo flexível, que se encaixava ao eletrodo fixado ao crânio do animal, permitindo a passagem de corrente elétrica para a SCPdl. Este aparato permitia a livre movimentação do animal na cuba.

3.5. Procedimentos Experimentais:

3.5.1. Cirurgia para implantação do quimitrodo

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich, EUA) a 2,5% (10 mL/Kg, i.p.). Após a indução anestésica, uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil) foi administrada (0,2 mL/animal, i.m.) a fim de prevenir possíveis infecções. Além disso, neste mesmo período, foi administrado (2,5 mg/mL/kg, s.c.) o agente analgésico com atividade antiinflamatória e antipirética, flunixinina meglumina (Banamine, Schering-Plough S/A-Brasil)

Os animais foram então adaptados a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA), com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural e a seguir, foi realizada a limpeza do campo cirúrgico com uma solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%. Na região da incisão foi administrado, por 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, a fim de expor a calvária e remover o perióstio por raspagem.

Na seqüência, dois orifícios foram perfurados, com o auxílio de uma broca dental tipo Dremel, para a introdução de parafusos de aço inoxidável. Estes parafusos serviram como âncora da prótese de acrílico a ser disposta no crânio do animal. Outro orifício foi perfurado para a introdução do quimitrodo a uma distância de 1,9 mm lateralmente ao lambda, a uma profundidade de 5,2 mm a partir da superfície craniana e inclinação de 22° em relação ao plano sagital, evitando-se, assim a perfuração do seio venoso. Após o implante, o quimitrodo foi fixado à calota craniana por meio de resina dental autopolimerizável. Finalmente, foi introduzido pela cânula-guia um mandril de aço inoxidável, de mesmo comprimento, para evitar possíveis entupimentos da cânula.

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

3.5.2. Testes Comportamentais

Entre cinco a sete dias após a cirurgia foram iniciadas as sessões de estimulação elétrica visando à determinação do limiar de fuga de cada animal. Primeiramente, o mandril era retirado da cânula-guia e a seguir, uma simulação de microinjeção era realizada, a fim de igualar as condições experimentais de pré e pós-injeção de droga. Nessa simulação, a agulha dental não ultrapassava o comprimento da cânula-guia e nenhuma substância era microinjetada. Em seguida, o cabo flexível era conectado ao quimitrodo e o animal era colocado na cuba por 5 minutos para adaptar-se às condições experimentais. Após este tempo, era iniciada a determinação dos limiares aversivos, por meio da estimulação da SCPdI.

A determinação dos limiares de fuga (limiar aversivo) era iniciada com a apresentação de um estímulo elétrico com intensidade de 20 μ A. A corrente elétrica

foi monitorada pico-pico por meio de um osciloscópio. O tempo de cada estímulo elétrico era de 10 segundos, seguidos de intervalos de 10 segundos.

Após cada intervalo, um novo estímulo, 4 μ A maior que o precedente, era 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. Caso não fosse observada a fuga até a intensidade de corrente elétrica de 152 μ A, o animal era excluído do experimento.

Uma vez determinado o limiar basal, grupos independentes de animais foram utilizados para avaliar o efeito da administração intra-SCPdl de drogas. Sendo assim, no experimento 1, após sorteio prévio, os animais receberam administração intra- SCPdl do antagonista de receptores GABA_A bicuculina (5 pmol/0,2 μ L) ou salina 5 minutos anteriores a injeção local de 5-HT (20 nmol/0,4 μ L), DOI (16 nmol/0,2 μ L), mCPP (40 nmol/0,2 μ L), RO 60-0175 (40 nmol/0,4 μ L) ou seus respectivos veículos. Neste experimento, como em todos os demais experimentos deste trabalho, a agulha foi retirada da cânula-guia 60 segundos após a microinjeção das drogas. Este procedimento foi adotado a fim de evitar o refluxo das mesmas. Dez minutos após a administração de 5-HT, 8-OH-DPAT, mCPP e RO-600175 ou 20 minutos após a de DOI, o limiar de fuga foi redeterminado. Estudos prévios demonstram que não há diferença entre os animais testados 10 ou 20 minutos após a injeção intra-SCPD de salina (Nogueira & Graeff, 1995). Então, todos os animais controles foram testados 10 minutos após a microinjeção de salina.

A dose do antagonista GABAérgico bicuculina foi escolhida com base no estudo de Cassaroto e colaboradores (2009), mostrando que na dose de 5 pmol este antagonista não interfere com o limiar de fuga no modelo da estimulação elétrica SCPD. Enquanto que as doses de 5-HT, DOI e 8-OH-DPAT foram baseadas em

estudos anteriores que demonstraram o efeito inibitório destas drogas sobre a resposta de fuga na SCPD (Schutz *et al.*, 1985; Nogueira & Graeff, 1995; Zanoveli *et al.*, 2005; de Bortoli *et al.*, 2006). Já a dose do agonista mCPP foi baseada nos estudos de Zanoveli e colaboradores (2003), mostrando que a dose de 40 nmol deste agonista inibe a resposta de fuga no labirinto em T elevado. Já a escolha da dose de RO 60-0175 foi baseada em de estudos pilotos conduzidos em nosso laboratório.

No experimento 2A, foram administrados (10 nmol/0,2µL) de quetanserina ou solução veículo 10 minutos anteriores à injeção de DOI (16 nmol/0,2 uL) ou salina. O limiar de fuga foi redeterminado 20 minutos após a administração de DOI ou 10 minutos após a administração de salina. A dose de quetanserina foi escolhida com base no estudo de Paula Soares e colaboradores (2004).

No experimento 2B, foram administrados (10 nmol/0,2µL) de SB- 242084 ou salina 5 minutos anteriores à injeção de RO 60-0175 (40 nmol/0,4µL) ou salina. A dose do antagonista foi escolhida com base no em estudos de Paula Yamashita & Hélio Zangrossi Júnior (2010, dados não publicados). O limiar de fuga foi redeterminado 10 minutos após a microinjeção de RO 60-0175 ou salina.

No experimento 2C, foram administrados (10 nmol/0,2µL) de quetanserina ou salina, 10 minutos anteriores à injeção de mCPP (40 nmol/0,2 uL) ou RO 60-0175 (40 nmol/0,4µL) ou salina. Apesar da solubilização do mCPP ter sido realizada em salina e o RO 60-0175 ter sido solubilizado em DMSO a 4%, a escolha da salina como controle ocorreu devido a um experimento realizado no decorrer deste trabalho demonstrando que não existem diferenças entre os limiares de animais microinjetados com salina, salina mais DMSO a 4% ou salina com Tween 80 a 2%

(ver apêndice 1). O limiar de fuga foi redeterminado 10 minutos após a microinjeção de mCPP , RO 60-0175 ou salina.

Durante a injeção intra-SCPDI da drogas, os animais permaneciam com livre movimentação em uma gaiola viveiro (39 x 32 x 16 cm) com serragem no assoalho. A injeção foi realizada por meio de uma agulha odontológica do tipo Mizzy, 0.3 mm de diâmetro externo inserida pela cânula- guia, até atingir o alvo, localizado a 1mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha era conectada a uma microsseringa (Hamilton, EUA) de 10 μ L através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido previamente com água destilada. Uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno separava a água destilada da droga a ser administrada. Durante a injeção, o deslocamento desta bolha foi utilizado para monitorar a microinjeção. Para controle do volume e tempo de injeção, foi utilizada uma bomba microinjetora digital (Harvard Apparatus).

Para cada animal, a variação do limiar em uA causada pela microinjeção da droga ou veículo na SCPDI foi considerada como a diferença entre o limiar de fuga redeterminado após o tratamento farmacológico e o limiar basal de fuga.

3.6.Perfusão

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com cloral 3% e submetidos à microinjeção na SCPDI de 0,2 μ l de corante azul de Evans a 1% e posterior perfusão intracardíaca com salina (NaCl a 0,9%) e formol (10%). Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e fixados em formol a 10% para posterior análise histológica.

3.7. Histologia

Os cérebros foram cortados em secções coronais de 60 µm de espessura em um criostato de congelação (Leica CM1850) para verificação microscópica, segundo as fotomicrografias do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram utilizados somente os dados dos animais que tiveram a ponta do eletrodo localizada dentro da SCPdl.

3.8. Análise dos resultados

Os efeitos das injeções intra-SCPdl de drogas foram avaliados por uma análise de variância de dois fatores (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os dados foram expressos pela média ± EPM

4. RESULTADOS

Análise histológica

Para a realização do experimento 1, foram operados 186 animais. Destes, 160 tiveram o sítio de injeção na SCPdl. Em 13 animais, esta estrutura não foi atingida, em 5 animais, o quimitrodo não conduziu corrente elétrica e 8 animais não apresentaram o comportamento de fuga até 152 μ A no dia do teste.

Para o experimento 2, foram operados 136 animais, 111 tiveram seus dados incluídos na análise estatística. Dos 25 animais restantes, em 12, a SCPD não foi atingida, em 5, o quimitrodo não conduziu corrente elétrica e 8 animais não apresentaram o comportamento de fuga até 152 μ A no dia do teste.

Uma ilustração dos sítios de injeção atingidos nos dois experimentos está apresentada na figura 1.

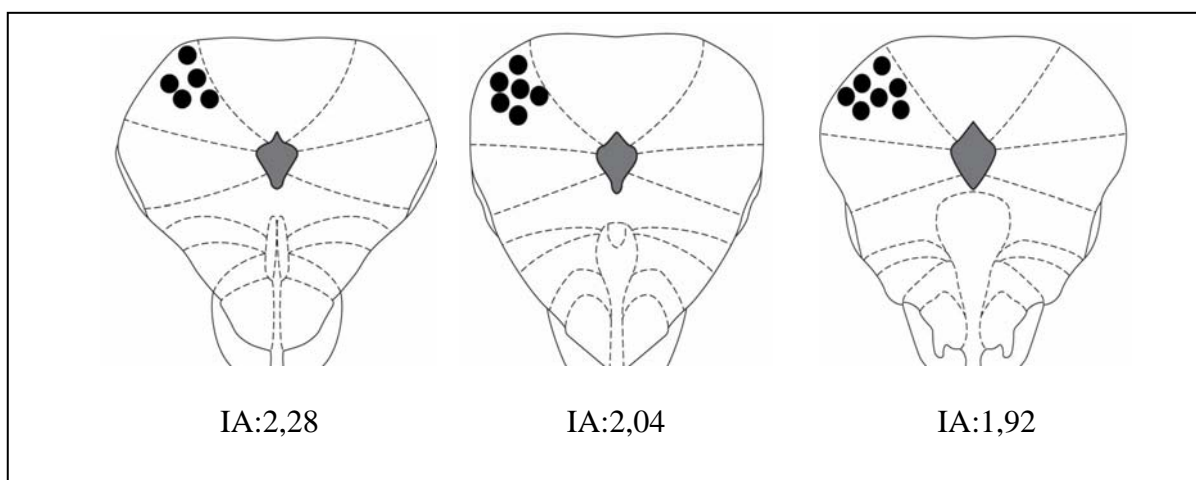


Figura 1: Diagrama de secções coronais (de 1,92 a 2,28 posterior a linha interaural (IA), Atlas de Paxinos e Watson, 2007) do encéfalo de ratos mostrando o sítio de injeção na SCPdl. O número de pontos na figura é menor que o número total de ratos, devido às sobreposições dos sítios de injeção.

Experimento 1

Efeito da administração intra-SCPdl de bicuculina sobre o aumento no limiar de fuga causado pela serotonina.

A figura 2 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de bicuculina previamente a injeção de 5-HT. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1, 32) = 10,030$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1, 32) = 0,976$; NS] e que ocorreu interação entre os tratamentos [$F(3, 63) = 6,429$; $p < 0,05$].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu sal/5-HT ($p < 0,05$). A administração prévia de bicuculina foi capaz de bloquear esse efeito.

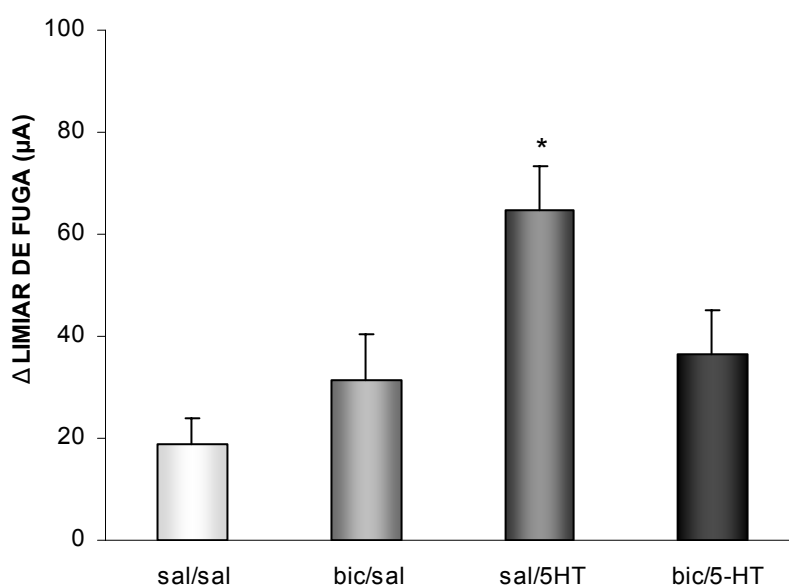


Figura 2: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra- SCPdl de bicuculina (5 pmol) ou salina 5min antes da microinjeção de salina ou 5-HT (20 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 8-10 por grupo). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

Efeito da administração intra-SCPdl de bicuculina sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo DOI.

A figura 3 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de bicuculina previamente a injeção de DOI. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1,34) = 26,561$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,34) = 8,709$; NS] e que ocorreu interação entre os tratamentos [$F(3,69) = 15,351$; $p < 0,05$].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu sal/DOI ($p < 0,05$). A administração prévia de bicuculina foi capaz de bloquear esse efeito.

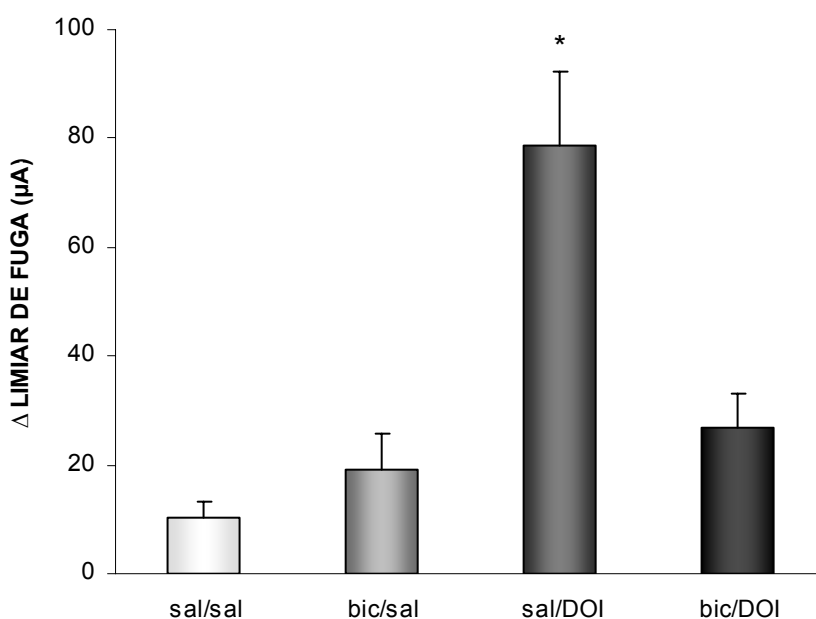


Figura 3: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra- SCPdl de bicuculina (5 pmol) ou salina 5min antes da microinjeção de salina ou de DOI (16 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 7-10 por grupo). * $p < 0,05$ em relação a todos os demais grupos.

Efeito da administração intra-SCPdl de bicuculina sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo 8-OH-DPAT.

A figura 4 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de bicuculina previamente a injeção de 8-OH-DPAT. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1,32) = 48,247$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,32) = 0,016$; NS] e que não há interação entre os tratamentos [$F(3,65) = 0,198$; NS].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior nos grupos de animais que recebeu sal/8-OH-DPAT ($p < 0,05$) independentemente do tratamento prévio com bicuculina.

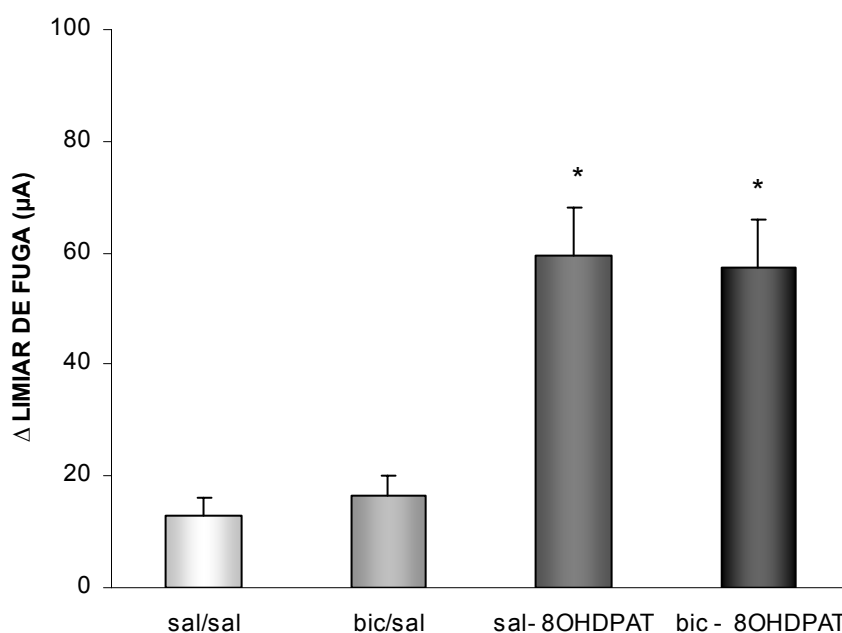


Figura 4: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra- SCPdl de bicuculina (5 pmol) ou salina 5min antes da microinjeção de salina ou 8-OH-DPAT (8 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 7-10 por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sal/sal.

Efeito da administração intra-SCPdl de bicuculina sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo mCPP.

A figura 5 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de bicuculina previamente a injeção de mCPP. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1,32) = 4,671$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,32) = 2,189$; NS] e que ocorreu interação entre os tratamentos [$F(3,67) = 6,242$; $p < 0,05$].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu sal/mCPP ($p < 0,05$). A administração prévia de bicuculina foi capaz de bloquear esse efeito.

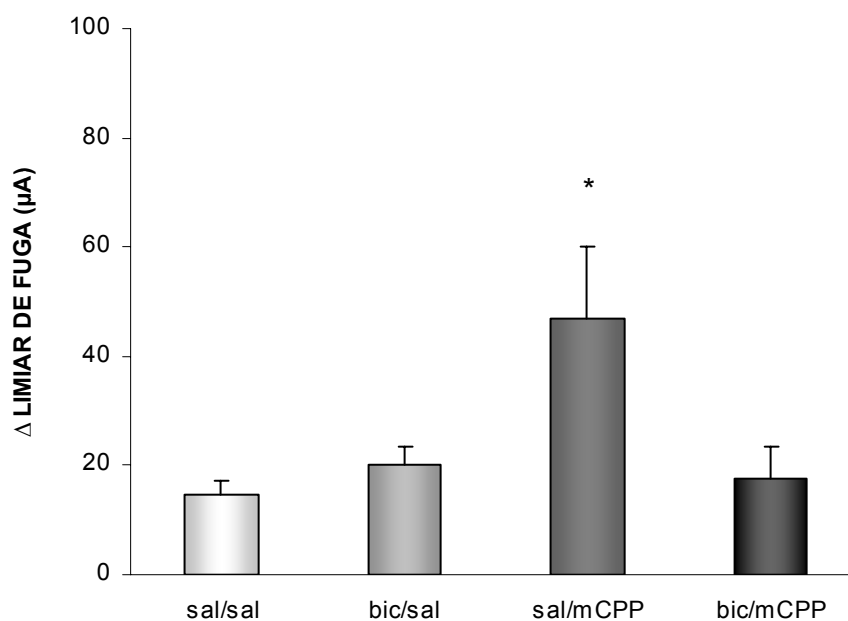


Figura 5: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra- SCPdl de bicuculina (5 pmol) ou salina 5min antes da microinjeção de salina ou de mCPP (40 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 8-9 por grupo). * $p < 0,05$ em relação a todos os demais grupos.

Efeito da administração intra-SCPdl de bicuculina sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo RO 60-0175.

A figura 6 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de bicuculina previamente a injeção de RO 60-0175. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1,27) = 6,362$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,27) = 4,020$; NS] e que ocorreu interação entre os tratamentos [$F(3,55) = 11,657$; $p < 0,05$].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu sal/RO 60-0175 ($p < 0,05$). A administração prévia de bicuculina foi capaz de bloquear esse efeito.

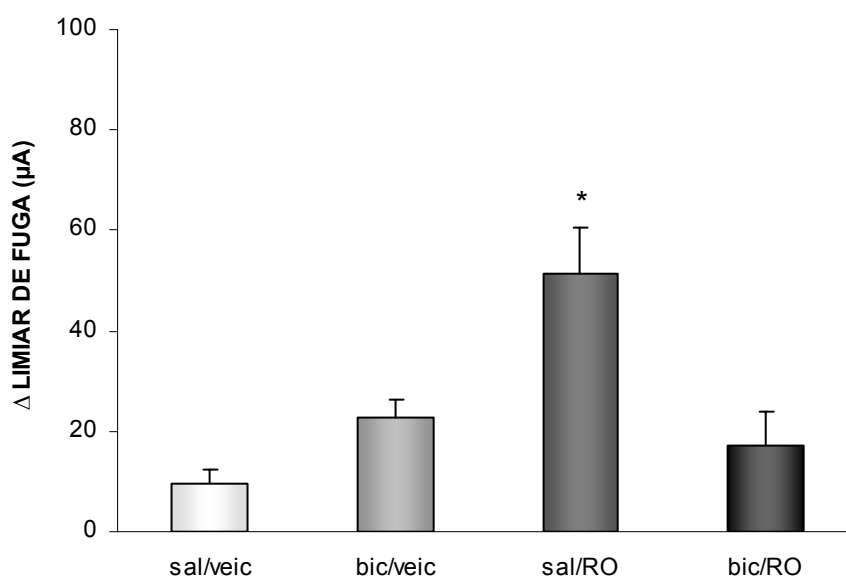


Figura 6: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra-SCPdl de bicuculina (5 pmol) ou salina 5min antes da microinjeção de salina ou de RO 60-0175(40 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 7 -8 por grupo). * $p < 0,05$ em relação a todos os demais grupos.

Experimento 2A: Efeito da administração intra-SCPdl de quetanserina sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo DOI.

A figura 7 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de quetanserina previamente a injeção de DOI. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1,28) = 11,684$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,28) = 8,719$; NS] e que ocorreu interação entre os tratamentos [$F(3,57) = 10,939$; $p < 0,05$].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu sal/DOI ($p < 0,05$). A administração prévia de quetanserina foi capaz de bloquear esse efeito.

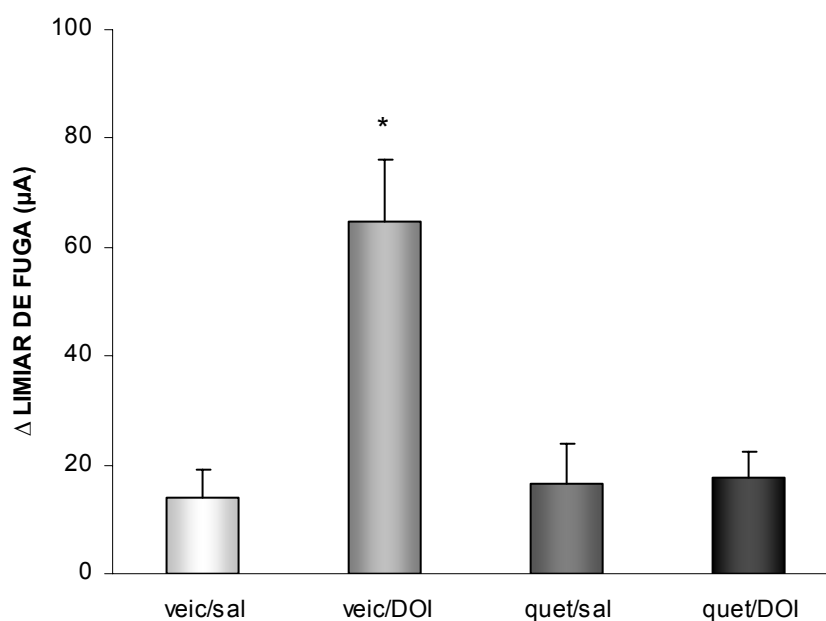


Figura 7: Efeito (Média ± EPM) da injeção intra-SCPdl de quetanserina (10 nmol) ou salina 10min antes da microinjeção de salina ou de DOI (16 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 7-9 por grupo).* $p < 0,05$ em relação a todos os demais grupos.

Experimento 2B: Efeito da administração intra-SCPdl de SB-242084 sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo RO 60-0175.

A figura 8 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de SB-242084 previamente a injeção de RO 60-0175. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com o agonista [$F(1,30) = 12,834$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,30) = 1,318$; NS] e que não há interação entre os tratamentos [$F(3,61) = 0,63$; NS].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior nos grupos de animais que recebeu sal/RO 60-0175 ($P < 0,05$) independentemente, do tratamento prévio com SB-242084.

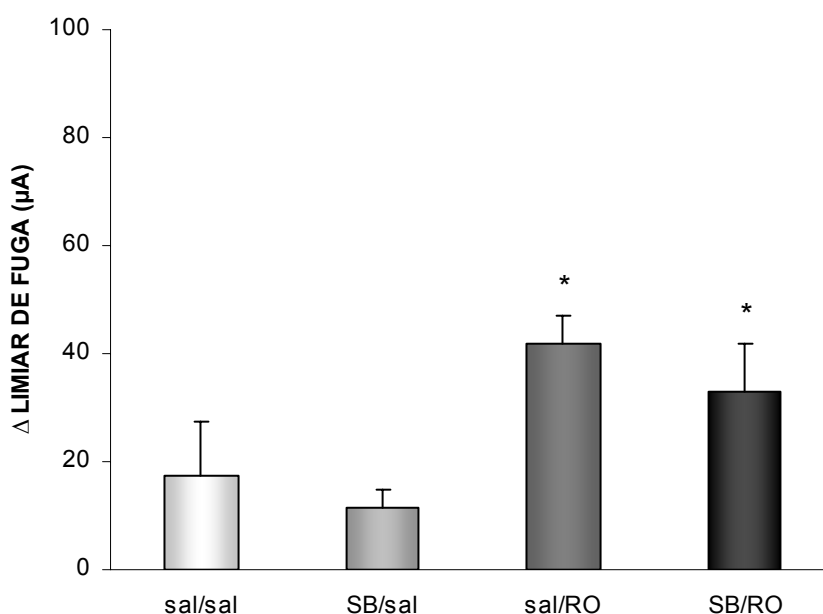


Figura 8: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra-SCPdl de SB-242084 (10 nmol) ou salina 5min antes da microinjeção de salina ou de RO 60-0175 (40 nmol) sobre o limiar de fuga ($n = 6-9$ por grupo). * $p < 0,05$ em relação a todos os demais grupos.

Experimento 2C: Efeito da administração intra-SCPdl de quetanserina sobre o aumento no limiar de fuga causado pelo mCPP e RO 60-0175.

A figura 9 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções na SCPdl de quetanserina previamente a injeção de mCPP ou RO 60-0175. A análise de variância de duas vias mostra o efeito do tratamento com os agonistas [$F(1,29) = 9,924$; $p < 0,05$], mas não com o antagonista [$F(1,29) = 3,845$; NS] e que ocorreu interação entre os tratamentos [$F(3, 59) = 4,366$; $p < 0,05$].

O teste de comparações múltiplas mostrou que a variação do limiar de fuga foi significativamente maior no grupo de animais que recebeu sal/mCPP ou sal/RO 60-0175 ($p < 0,05$). A administração prévia de quetanserina foi capaz de bloquear o efeito de ambos os tratamentos.

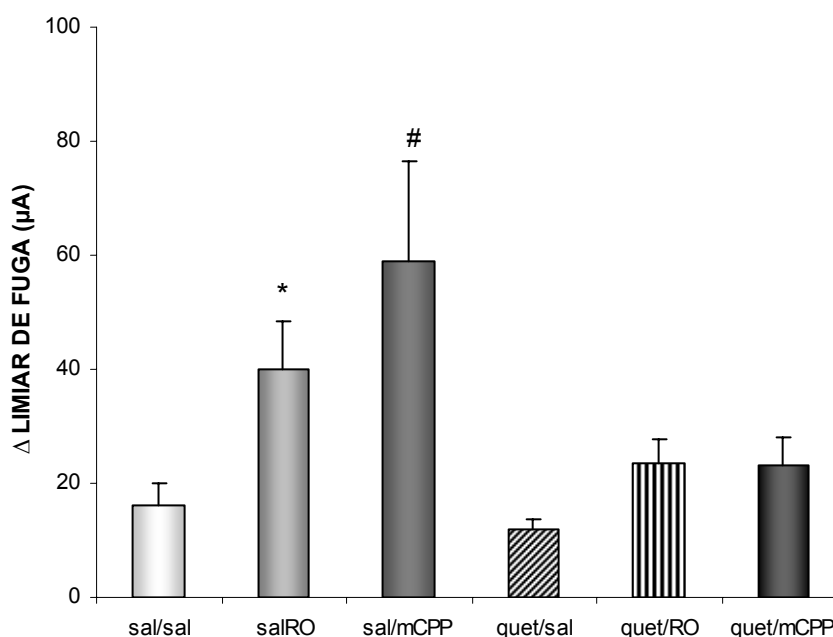


Figura 9: Efeito (Média ± EPM) da injeção intra-SCPdl de quetanserina (10 nmol) ou salina 10min antes das microinjeções de salina, mCPP (40 nmol) ou de RO 60-0175 (40 nmol) sobre o limiar de fuga (n= 8-10 por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sal/sal e respectivos grupos tratados com quetanserina.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliamos a hipótese de que o efeito antiaversivo resultante da administração intra-SCPdl de agonistas serotoninérgicos de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} decorra da facilitação da neurotransmissão GABAérgica local.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com evidências prévias da literatura mostrando que a administração do agonista endógeno 5-HT, do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI e do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT inibe os efeitos aversivos da estimulação elétrica da SCPD (Nogueira & Graeff, 1995; Schutz et al., 1985).

Adicionalmente, o presente trabalho estende tais investigações ao demonstrar que a administração do agonista não seletivo para receptores do tipo 5-HT_{2C} mCPP e do agonista de receptores do tipo 5-HT_{2C} RO 60-0175 também inibe a resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica da SCPD. É interessante ressaltar que, embora em trabalhos prévios de Nogueira e Graeff (1995) o mCPP, na doses de 16 e 32 nmol, não promoveu aumento no limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD, no presente estudo, o emprego de uma dose maior deste agonista (40nmol), levou a um aumento neste limiar.

Tal resultado assemelha-se ao obtido por Zanoveli e colaboradores (2003), em que a injeção intra-SCPD de 40 nmol de mCPP inibiu o comportamento de fuga evocada no labirinto em T elevado (para revisão deste teste ver Graeff et al 1988), sugerindo um efeito do tipo panicolítico. Neste mesmo estudo foi observado que o mCPP facilitou a aquisição da resposta de esquiva inibitória, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico. Já quanto ao agonista RO 60-0175, nossos resultados fornecem as primeiras evidências do efeito inibitório deste agonista sobre a resposta de fuga evocada pela estimulação da SCPdl.

Nossos resultados mostraram ainda que a administração de 5 pmol do antagonista de receptores GABA_A bicuculina bloqueou o efeito inibitório sobre a resposta de fuga promovido pela injeção intra-SCPdl de 5-HT ou de DOI. Embora, o mesmo não ocorre quando a bicuculina foi administrada previamente ao 8-OH-DPAT.

Adicionalmente, observamos no experimento 2A que a administração intra-SCPdl de quetanserina promoveu o bloqueio sobre a resposta de fuga induzida pelo agonista DOI. Tais resultados, em conjunto indicam que o efeito do DOI ocorra primariamente pela sua interação com receptores do tipo 5-HT_{2A}. Ademais, em estudos prévios de Soares & Zangrossi (2004), o efeito do DOI sobre a resposta de fuga evocada no labirinto em T elevado também foi bloqueado pela administração prévia de quetanserina. Desta forma, nossos resultados suportam a hipótese de que a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} facilite a neurotransmissão GABAérgica na SCPdl, promovendo a inibição da resposta de fuga evocada pela estimulação elétrica desta estrutura encefálica.

Outros estudos na literatura sustentam a relação entre a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} e a facilitação da neurotransmissão GABAérgica. Assim, Massé e colaboradores (2007) demonstraram que a administração sistêmica de dois antagonistas de receptores GABA_A, a bicuculina e a picrotoxina, bloqueia o efeito ansiolítico causado pela administração aguda de DOI no teste das quatro plataformas. Já a administração de doses subeficazes do agonista de receptores GABA_A muscimol potencializou o efeito do DOI. Neste mesmo estudo, os autores relataram que a administração de doses subeficazes de agonistas benzodiazepínicos, como o alprazolam e o diazepam, potencializa o efeito ansiolítico do DOI, tanto no teste das quatro plataformas, como no labirinto em cruz elevado. No entanto, a administração do antagonista benzodiazepínico flumazenil não altera a

resposta comportamental induzida pelo DOI (Massé et al., 2007). Desta maneira, os autores sugerem que a interação entre o sistema GABAérgico e o DOI não envolva o sítio de ligação para benzodiazepínicos.

Nesta mesma direção, Donatti e Panissi (2009) demonstraram que a injeção prévia de bicuculina no núcleo basolateral do complexo amigdalóide foi capaz bloquear a redução da resposta defensiva de imobilidade tônica resultante da administração do agonista de receptores 5-HT₂ α -metil-5-HT nesta mesma estrutura. Vale aqui mencionar que a resposta de imobilidade tônica tem sido associada a situações de perigo intenso e inescapável (Donatti & Panissi., 2009). Tal resultado corrobora com estudos eletrofisiológicos demonstrando que os receptores do tipo 5-HT_{2A} do núcleo basolateral do complexo amigdalóide modulam a facilitação da neurotransmissão GABAérgica nesta estrutura pela administração de α -metil-5-HT (Jiang et al., 2009).

De maneira semelhante ao ocorrido com a injeção intra-SCPdl dos agonistas DOI e 5-HT, nossos resultados mostram que a administração prévia de bicuculina bloqueou o efeito inibitório sobre a resposta de fuga promovido pelo agonista não seletivo para receptores do tipo 5-HT_{2C} mCPP e pelo agonista desse mesmo subtipo de receptor, o RO 60-0175.

Apesar destes resultados indicarem que o efeito antiaversivo resultante da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2C} decorra da facilitação da neurotransmissão GABAérgica na SCPdl. No experimento 2B, a administração prévia de 10nmol do antagonista seletivo para receptores do tipo 5-HT_{2C} SB-242084 não bloqueou o efeito sobre a resposta de fuga promovido pelo RO 60-0175, sugerindo que o efeito desta droga seja decorrente da ativação de outros receptores que não os do subtipo de receptores 5-HT_{2C}.

Neste sentido, Vicente & Zangrossi (2009) mostram que, no núcleo basolateral do complexo amigdalóide, o SB-242084 antagonizou o efeito do tipo ansiogênico promovido pela 5-HT no labirinto em T elevado, com uma dose 1000 vezes menor que a utilizada no presente trabalho. Curiosamente, nessa estrutura, a microinjeção do agonista MK-212 não alterou a resposta de fuga promovida no labirinto em T elevado, sugerindo que os receptores do tipo 5-HT_{2C} não participam da regulação da resposta de fuga neste modelo.

Desta forma, no experimento 2C verificamos se o efeito antiaversivo dos agonista mCPP e do RO 60-0175 poderia ser decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A}. Embora a afinidade do mCPP por receptores do tipo 5-HT_{2C} seja 3 vezes maior que por receptores do tipo 5-HT_{2A} (Knight et al., 2004) e o RO 60-0175 apresente afinidade 6 vezes maior pelos receptores do tipo 5-HT_{2C} que por receptores 5-HT_{2A}, (Knight et al., 2004) não podemos descartar a possibilidade de que ambas as drogas tenham atuado através da ligação com receptores do tipo 5-HT_{2A}.

Nossos resultados mostram que o antagonista quetanserina, que apresenta afinidade aproximadamente 8 vezes maior pelo receptor do tipo 5-HT_{2A}, comparado ao receptor do tipo 5-HT_{2C} (Knight et al., 2004), foi capaz de bloquear o efeito destes agonistas sobre a resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica da SCPdl. Nossos resultados assemelham-se aos obtidos em estudos com camundongos, em que a administração intra-SCPD de quetanserina, também promoveu o bloqueio do efeito ansiolítico causado pelo agonista mCPP no labirinto em cruz elevado (Nunes-de-Souza et al., 2008).

Como no presente estudo, resultados recentes do nosso grupo de pesquisa (Paula S. Yamashita & Hélio Zangrossi Júnior 2010, dados não publicados) reforçam

a idéia de que a ativação do subtipo de receptores 5-HT_{2C} na SCPD não altera a resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica desta mesma estrutura. Mais precisamente, a administração do agonista de receptores do tipo 5-HT_{2C} MK-212 que apresenta afinidade 20 vezes maior para receptores do tipo 5-HT_{2C}, que para os receptores do tipo 5-HT_{2A} (Knight., 2004), não altera o limiar de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD. Curiosamente, os receptores do tipo 5-HT_{2C} na SCPD modulam a resposta de esquiva inibitória no labirinto em T elevado. Tal resposta tem sido associada a ansiedade generalizada (Graeff et al., 1988).

Em suma, os dados do presente trabalho sustentam a hipótese de Nogueira Graeff (1995) de que a ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A}, presentes em interneurônios GABAérgicos, facilita a liberação de GABA com a consequente inibição da resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica da SCPD. Tal mecanismo é condizente com o bloqueio promovido pela bicuculina sobre o efeito do tipo panicolítico gerado tanto pela administração do agonista endógeno 5-HT como do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} DOI. De maneira semelhante, o efeito antiaversivo promovido pela administração dos agonistas mCPP e RO 60-0175 parece ser decorrente da ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A}, o que levaria ao aumento da neurotransmissão GABAérgica com a consequente inibição da resposta de fuga.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que:

- A ativação de receptores do tipo 5-HT_{2A} na SCPdl presentes em interneurônios GABAérgicos, facilita a liberação de GABA com a consequente inibição da resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica da SCPdl
- A ativação de receptores do tipo 5-HT_{2C} na SCPdl não altera a resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica desta mesma estrutura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth edition, text revision, 2000.

Audi EA, Graeff FG. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal grey mediate anti-aversive drug action. *Eur J Pharmacol*, 103(3-4):279-285,1994.

Bandler R, Keay KA, 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 MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci*, 17(9):379-389, 1994.

Bernik M. Relevância médico-social do transtorno do pânico. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 28,2001. Disponível em http://hcnet.usp.br/ipq/revista/28_1/artigos/art05.htm

Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T. In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol*, 149(7):861-9, 2006.

Brandão ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC. GABAergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev*.29(8):1299-311,2005.

Brandão ML, Cardoso SH, Melo LL, Motta V, Coimbra NC. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav. Rev* 18(3):339-346,1994.

Brandao ML, Di Scala G, Bouchet MJ, Schmitt P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(3):497-501, 1986.

Brandão ML, Lopez-Garcia JA, Graeff FG, Roberts MHT. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurones of the rat midbrain tectum. *Brain Research* 556,259-266,1991.

Brandão ML. Modo de ação dos agentes ansiolíticos e mediação química na matéria cinzenta periaquedutal. Tese apresentada à faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em farmacologia,1981.

Bubar MJ, Cunningham KA. Distribution of serotonin 5-HT_{2C} receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 25;146(1):286-97 2007.

Casarotto PC, de Bortoli VC, de Aguiar Corrêa FM, Moraes Resstel LB, Zangrossi H. Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010 Jan 5:1-10.

Cassano GB, Savino M. Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology. In: Montgomery, SA. *The psychopharmacology of panic*. New York: Oxford University Press, 1993, p. 38-57.

de Bortoli VC, Nogueira RL, Zangrossi H Jr. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)* 183(4):422-8 2006.

de Paula Soares V, Zangrossi H Jr. 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* 30;64(2):181-8, 2004.

Del-Ben CM, Graeff FG. Panic disorder: is the PAG involved? *Neural Plast*, 2009:1-9. Review. 2009.

Fernandez de Molina A, Hunsperger RW. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, striaterminalis, and adjacent structures. *J. Physiol*, 145(2):251-265,1959.

Fyer AJ, Mannuzza S, Chapman TF, Martin LY, Klein DF. Specificity in familial aggregation of phobic disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*,52(7):564-573,1995.

Gentil V. The aversive system, 5-HT and panic attacks. In: Simon P, Soubrié P, Wildlocher D. *Selected models of anxiety, depression and psychosis*. Basel: Karger, 1988, v. 9, p. 142-145.

Goetz RR, Klein DF, Gorman JM. Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety*, 1:31-36, 1994.

Graeff FG, Brandão ML, Audi EA, Schütz MT. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res*, Nov;22(2):173-80 1986.

Graeff FG. Animal models of aversion. In: Simon P, Soubrié P, Wildlocher, D. Selected models of anxiety, depression and psychosis. Basel: Karger, 1988, v. 9, p. 115-141.

Graeff FG. Ansiedade. In: Graeff, FG, Brandão ML. Neurobiologia das doenças mentais. 5a ed. São Paulo: Lemos, 1999, p. 135-178.

Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 27(4):811-829, 1994.

Graeff FG. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163(3-4):467-476, 2002.

Graeff FG. Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr*, Suppl 2:42-45, 2003.

Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*;28(3):239-59 . 2004.

Griffits JL, Lovick TA. Co-localization of 5-HT_{2A} receptors and GABA immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett*, 326(3):151-154,2002.

Guimarães FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103:91-94, 1991.

Hetem LAB. & Graeff FG. Transtornos de Ansiedade. 1ªed., São Paulo, Atheneu, 2004.

Hofer MA. An evolutionary perspective on anxiety. In: Roose, S.P.& Glick RA (eds). Anxiety as symptom and signal. Analytic Press, Hillsdale, NJ,1995.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71 533–554, 2002.

Jenck F, Broekkamp CLE, van Delft AML. Opposite control mediated by central 5-HT_{1A} and non-5-HT_{1A}(5-HT_{1B} or 5-HT_{1C}) receptors on periaqueductal gray aversion. *Eur J Pharmacol* 177:201-4 1989.

Jenck F, Broekkamp CLE, van Delft AML. The effect of antidepressant on aversive PAG stimulation. *Eur J Pharmacol* 177:201-4 1990.

Jenck F, Moreau JL, Martin JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res*, 57(2):181-191, 1995.

Jiang X, Xing G, Yang C, Verma A, Zhang L, Li H. Stress impairs 5-HT_{2A} receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 34(2):410-23,2009.

Kiser RS, Brown CA, Sanghera MK, German DC. Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fear-like behavior. *Brain Res* 191:265-72, 1980.

Kiser RS, Lebovitz RM German DC. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Res*,155: 331-342, 1978.

Kiser RS, Lebovitz RM. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol. Behav*,15: 47-53, 1975.

Klein DF, Fink M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. *Am. J. Psychiatry*, 119:432-438, 1962.

Klein DF. Anxiety reconceptualized. *Compr Psychiatry*, 21(6):411-27, 1980.

Klein DF. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacologia*, 5:397-408, 1964.

Knight AR, 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.

Liu S, Bubar MJ, Lanfranco MF, Hillman GR, Cunningham KA. Serotonin_{2C} receptor localization in GABA neurons of the rat medial prefrontal cortex: implications for understanding the neurobiology of addiction. *Neuroscience* 146(4):1677-88 2007.

Marseillan RF. A solid state sine-wave stimulator. *Physiol Behav*. 19(2):339-40 1977.

Massé F, Hascoët M, Bourin M. Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test in mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17(6-7):483-91, 2007.

Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD. When fear is near. *Science.* 317:1079-1083, 2009.

Nashold JrBS, Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, 30(1):14-24, 1969.

Nashold JrBS, Wilson WP, Slaughter DG. The midbrain and pain. In: Bonica, J. J. (ed.) *Advances in Neurology*, v.4: International Symposium on Pain. New York, Raven Press, 1974. p.191-196.

Nogueira RL, Graeff FG. 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 RL, Rodgers RJ, Canto-de-Souza A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behav Brain Res*, 11;187(1):72-9, 2008.

Nutt DJ, George DT. Serotonin and anxiety. In: Burrows GD, Roth M, Noyes Jr R. *Handbook of anxiety. The neurobiology of anxiety.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, vol 3 189-221, 1990.

Panissi CRAL, Donatti AF. GABAergic antagonist blocks the reduction of tonic immobility behavior induced by activation of 5-HT₂ receptors in the basolateral nucleus of the amygdala in guinea pigs. *Brain Res Bull* 14;79(6):358-64, 2009.

Panksepp J. Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behav Brain Sci* :407-67, 1982.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 6th ed., San Diego: *Elsevier Academic Press*, 2007.

Pereira MEC. O conceito de ansiedade. In: Hetem LAB & Graeff FG. *Transtornos de ansiedade.* São Paulo: Atheneu, 2004, p3-28.

Pratt JA. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther*, 55(2):149-181, 1992.

Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiatry*, 46(6): 493-500, 1989.

Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC. Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(7-8):647-659, 2001.

Schenberg LC, Graeff FG. Role of periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 9:287-295, 1978.

Schmitt P, Carrive P, Di Scala G, Jenck F, Brandao M, Bagri A, Moreau JL, Sandner G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behav Brain Research* 22(2) 181-190, 1986.

Schutz MTB, Aguiar JC, Graeff FG. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal gray matter. *Psychopharmacol.*, v.85, p.340-345, 1985.

Stein DJ, Bouwer C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. *J Anxiety Disord*, 11(4):409-29, 1997.

Teixeira KV, Carobrez AP. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci* 113:196-203, 1999.

Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of dorsal raphe nucleus in the rat. *J comp Neurol* 313 (4): 643-68,1991.

Vicente MA, Zangrossi HJr. Papel dos receptores 5-HT_{2C} no núcleo basolateral do complexo amigdalóide de ratos na modulação do comportamento defensivo. Dissertação apresentada à faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em farmacologia, 2009.

Zanoveli JM, Netto CF, Guimarães FS, Zangrossi HJr. Systemic and intra – dorsal periaqueductal gray injections of cholecystokinin sulfated octapeptide (CCK-8s) induce a panic –like response in the rats submitted to the elevated T-maze. *Peptides*, 25(11): 1935-1941,2004.

Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi HJr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one – way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur. J. Pharmacol.*;473 (2-3): 153-161,2003.

ANEXO

Anexo 1

Efeito da administração intra-SCPdl dos controles sal, sal+DMSO e sal+Tween sobre a resposta de fuga

A figura 10 ilustra a variação de limiar de fuga de animais que receberam injeções de 0,2 μ L, na SCPdl de salina, salina+ DMSO 4% e salina +Tween80 a 2%. A análise de variância de uma via mostra que não ocorreu diferença entre os tratamentos [$F(1, 17) = 2,574$; NS].

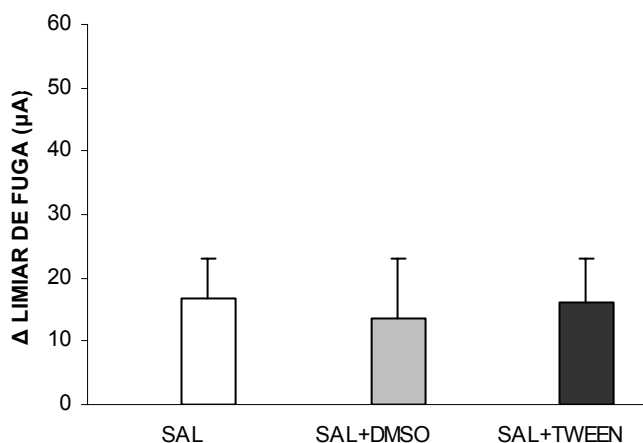


Figura 10: Efeito (Média \pm EPM) da injeção intra-SCPdl dos controles sal, sal+DMSO, sal+Tween (n=5-7 por grupo). Os resultados demonstram que não existe diferença entre os grupos.

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](#)