

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIA E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Papel dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da matéria cinzenta periaquedutal nas reações de defesa em camundongos: influência da experiência prévia ao teste e do modelo empregado

Karina Santos Gomes

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia

Ribeirão Preto - SP
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIA E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Papel dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da matéria cinzenta periaquedutal nas reações de defesa em camundongos: influência da experiência prévia ao teste e do modelo empregado

Karina Santos Gomes

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Ribeirão Preto - SP
2009

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

Gomes, Karina Santos

Papel dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da matéria cinzenta periaquedutal nas reações de defesa em camundongos: influência da experiência prévia ao teste e do modelo empregado. Ribeirão Preto, 2009.

148 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Nunes-de-Souza, Ricardo Luiz.

1. Camundongo. 2. Labirinto em cruz elevado. 3. Matéria cinzenta periaquedutal 4. One-trial tolerance. 5. Teste de exposição ao rato. 6. Receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}

Ao Daniel, meu amor, maior incentivador, que comemorou comigo cada conquista e foi minha força motriz durante o meu doutorado e ao Rafael, meu sobrinho e afilhado, que acaba de entrar em minha vida, eu dedico amorosamente esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, os meus sinceros agradecimentos não só pela orientação deste trabalho, mas também pela amizade, sabedoria e apoio incondicional em todos os momentos e valiosa contribuição à minha formação científica.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Aos meus pais Maria e João, que acreditaram no meu potencial e que com muito esforço me proporcionaram a educação necessária para que eu chegasse até aqui.

À toda minha família, cujos nomes eu não vou citar para não correr o risco de deixar alguém de fora, pelo amor e apoio durante essa jornada.

Aos sogros Euclides e Abigail (*in memoriam*) pelo exemplo de perseverança, carinho e apoio constantes.

Aos professores Marcus Lira Brandão, Hélio Zangrossi Jr. e Leandro Bertoglio pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho, pela amizade e supervisão no estágio de docência na disciplina de Psicofarmacologia na USP.

À Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta pela amizade e supervisão do meu período de docência na disciplina de Farmacoterapia na UNESP como professor bolsista.

Aos professores José Francisco Fracasso, Maria do Carmo Longo e Paulo Nogueira pela amizade e boa convivência durante todos esses anos.

As técnicas do laboratório de Farmacologia da FCF/UNESP Elisabete e Rosana pela amizade e excepcional colaboração técnica, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

À secretária Renata pelo trabalho na secretaria da Psicobiologia.

Aos funcionários da secretaria da CPG, pela solicitude e pelo competente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Eduardo, Tarciso, Alianda, Otávio, Fábio, Rodrigo, Marcelo, Joyce, Yara, Egberto, Paulão, Roberta, Paula, Cássia, Leonardo, Juliana, Kátia, Tati e Diego pela amizade e apoio durante este período (se eu esqueci alguém, perdão, foi só formalmente!).

Agradecimentos especiais: à Vanessa Amaral que, além de grande amiga, foi também parceira de experimentos nesse e em outros trabalhos e parceira nas cervejas filosóficas de meio de semana; à Ana Cláudia Cipriano, uma amiga pro que der e vier, nas horas boas e ruins.

À secretária do departamento PANT Tirene Pavaneli, pela excepcional competência, irreverência e amizade.

Aos amigos da Psicobiologia pelas dicas, amizade e receptividade sempre que eu precisei.

Um outro agradecimento especial à Julia Santos pela grande amizade, apoio, moradia durante os períodos de estágio de docência e disciplinas em Ribeirão Preto e claro, pelo divertimento nas saídas pra tomar umas cevas.

As amigades que foram extremamente importantes no período de doutorado *sandwich* na Suíça: Flavia May, Corinne Brana, Sascha Jautze, Vadim Dolgov, Marta Calzolaio, Regina Reimer, Felipe Brandt, Marlon Machado, Ingrid e Lukas Mittelbach, Gabriele Salvo, Ufuk Olgac e Aelys Humphreys.

Aos funcionários da Biblioteca, Portaria, Biotério e Seção de Transportes da FCFAR da UNESP, em especial para aqueles da Seção de Apoio da FCF/UNESP pelo excelente trabalho e constante alto astral.

Aos sujeitos utilizados na pesquisa, o meu agradecimento e respeito pela incalculável contribuição.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara pela concessão de espaço físico, equipamentos e materiais necessários para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela bolsa concedida e apoio financeiro para o projeto.

A Deus, por me dar saúde e ânimo para que eu realizasse mais essa etapa de minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	12
As Reações de Defesa e sua Relação com Medo e Ansiedade.....	12
Labirinto em cruz elevado (LCE).....	17
Teste de exposição ao rato.....	20
Matéria Cinzenta Periaquedutal e Serotonina.....	21
OBJETIVOS	27
ETAPA A	
EXPERIMENTO 1: Efeito do tratamento sistêmico com diazepam no teste e reteste em camundongos no labirinto em cruz elevado.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS	29
RESULTADOS	32
EXPERIMENTO 2: Curva de corticosterona plasmática em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS	38
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	42
ETAPA B	
EXPERIMENTO 3: Efeito dos agonistas 5-HT _{1A} 8-OH-DPAT, 5-HT _{2A/2C} DOI e 5-HT _{2C} MK-212 intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.....	46
MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1: Efeito do agonista 5-HT _{1A} 8-OH-DPAT intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.....	51
RESULTADOS	51

3.2: Efeito do agonista 5-HT _{2A/2C} DOI intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.....	54
RESULTADOS	55
3.3: Efeito da administração sistêmica do antagonista 5-HT _{2A} eplivanserina previamente à injeção do agonista 5-HT _{2A/2C} DOI intra-MCPd na reexposição de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado.....	58
RESULTADOS	61
3.4: Efeito do agonista 5-HT _{2C} MK-212 intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.....	67
RESULTADOS	68
DISCUSSÃO	71
ETAPA C	
3.5: Efeito do agonista 5-HT _{2A/2C} DOI intra-MCPd em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato.....	81
MATERIAIS E MÉTODOS	81
RESULTADOS	84
DISCUSSÃO	88
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	114

GOMES, K. S. **Papel dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da matéria cinzenta periaquedutal nas reações de defesa em camundongos: influência da experiência prévia ao teste e do modelo empregado.** 2009. 148 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

RESUMO

A exposição de roedores ao labirinto em cruz elevado (LCE) aumenta a esquivas aos braços abertos e leva à perda do efeito de fármacos ansiolíticos numa reexposição ao aparelho, um fenômeno conhecido como “one-trial tolerance” (OTT). Dentre as hipóteses sugeridas para explicar a OTT estão a mudança qualitativa de estado emocional e a habituação da atividade locomotora. O presente estudo investigou os efeitos de exposições sucessivas de camundongos ao LCE sobre os níveis de corticosterona plasmática. Ainda, o estudo empregou injeção sistêmica de diazepam antes do teste e reteste para avaliar se a experiência prévia com o fármaco também poderia influenciar o comportamento numa reexposição. Com base em evidências sugestivas do envolvimento de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPd) na modulação da ansiedade o presente estudo também examinou os efeitos dos agonistas de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (5,6 e 10 nmol), 5-HT_{2A/2C} DOI (2 e 8 nmol) e 5-HT_{2C} MK-212 (21,2 e 63,6 nmol) sobre o comportamento de camundongos que receberam microinjeções intra-MCPd antes do teste e reteste no LCE. Os resultados com o diazepam mostraram um efeito ansiolítico no teste, mas não no reteste. Os resultados mostraram que a hipótese de habituação do comportamento exploratório é contraposta por aumentos nos níveis de corticosterona plasmática tanto no teste como no reteste. Além disso, 8-OH-DPAT (5,6 e 10 nmol) não produziu efeitos sobre o comportamento de camundongos, enquanto as microinjeções de DOI (8 nmol) produziram um efeito antiaversivo na reexposição somente em animais que receberam o mesmo tratamento intra-MCPd antes do teste. A administração sistêmica de eplivanserina (0,1 mg/Kg), um antagonista de receptores 5-HT_{2A} antes do reteste não foi conclusiva na tentativa de elucidar o subtipo de receptor envolvido no efeito antiaversivo do DOI. Além disso, o tratamento intra-MCPd com MK-212 (63,6 nmol) foi ansiolítico em ambos o teste e reteste. Haja vista que reexposição ao LCE pode eliciar uma emoção diferente daquela desencadeada numa primeira exposição, o agonista DOI intra-MCPd (8 e 16 nmol) foi testado em um modelo de interação presa-predador, o teste de exposição ao rato (TER), no qual um resultado sugestivo de efeito próaversivo foi obtido. Esses resultados confirmam a MCPd como uma estrutura crucial na neurobiologia da OTT, além de demonstrarem a participação de receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} dessa estrutura mesencefálica no estado emocional induzido pela exposição e reexposição de camundongos ao LCE.

GOMES, K. S. **Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors of periaqueductal gray matter on defensive reactions in mice: influence of retest and model used.** 2009. 148 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ABSTRACT

A single exposure to the elevated plus-maze test (EPM) increases open arms avoidance and reduces or abolishes the anxiolytic-like effect of benzodiazepines assessed during a second trial, a phenomenon defined as "one trial tolerance" (OTT). Among other hypothesis, the OTT is considered to be due to a qualitative shift in the emotional state across the test-retest sessions or a locomotor habituation. The present study investigated the corticosterone levels in mice successively exposed to the EPM. The study also investigated whether the drug experience with diazepam prior to test and retest could also change the anxiety-like behaviour on a second trial. Given that intra-dPAG injections of a wide range of serotonergic 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists produce anxiolytic-like effects in rodents, the present study examined the effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (5.6 and 10 nmol) the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI (2 and 8) and the preferential 5-HT_{2C} receptor agonist MK-212 (21.2 and 63.6 nmol) microinjected into the dPAG prior to Trial 1 and Trial 2 on the behaviour of mice in the EPM. The results showed that diazepam provoked an anxiolytic-like effect on trial 1 but a lack of effect on trial 2. The locomotor habituation hypothesis is contradicted by present results showing an enhanced level of plasmatic corticosterone on both test and retest. Furthermore, the results showed a lack of 8-OH-DPAT (5.6 and 10 nmol) effect on the behaviour of maze-naïve and maze-experienced mice, while intra-dPAG microinfusions of DOI (8 nmol) reduced anxiety-like behaviour only in maze-experienced mice that had received a similar treatment prior to Trial 1. The systemic treatment with the 5-HT_{2A} antagonist eplivanserin (0.1mg/kg) prior to trial 2 was not conclusive to elucidate the 5-HT subtype receptor involved in the antiaversive effect of DOI. Moreover, intra-dPAG MK-212 (63.6nmol) showed an anxiolytic-like effect on both Trial 1 and Trial 2. As the trial 2 may induce a different emotional state, intra-PAG infusions of DOI (8 and 16 nmol) were performed in a prey-predator interaction model, the rat exposure test (RET), which resulted in a suggestive proaversive effect. Overall the results support the dPAG as a crucial structure involved in the neurobiology of the OTT phenomenon as well as accounting the role of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors located within this midbrain structure on the emotional state induced by EPM test and retest paradigm in mice.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As Reações de Defesa e sua Relação com Medo e Ansiedade

O medo e a ansiedade são estados emocionais correlacionados, qualificados subjetivamente como desagradáveis, acompanhados por sentimentos de apreensão e insegurança e um conjunto de alterações comportamentais e psicofisiológicas. Graeff (1990) cita como uma das raízes principais da ansiedade o sentimento de medo, por ser encontrado praticamente em todas as espécies e que tem como função sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. A diferença entre os dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1990).

Do ponto de vista evolucionário, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que se originam nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Historicamente, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade teve início nos relatos de Darwin (reimpressão em 2000), em sua obra, “A expressão das emoções no homem e nos animais”, a qual apontou o caminho, seguido em nosso século pela Etologia, de buscar o valor adaptativo dos processos comportamentais e psicológicos.

Mesmo com as dificuldades inerentes ao objeto de estudo das bases neurais do medo e ansiedade, nas últimas décadas, um considerável progresso no conhecimento na neurobiologia dessas emoções foi derivado do somatório de experimentos com animais

de laboratório e achados clínicos (pacientes com lesão cerebral, neurocirurgias e estudos de neuroimagem). A respeito dos principais construtos teóricos elaborados, cabem destaque o sistema cerebral de defesa (SCD) e o sistema de inibição comportamental (SIC). O primeiro teve início com os trabalhos de Hess e Brügger (1943), os quais demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial em gatos eliciou respostas defensivas de luta e fuga, acompanhadas de alterações neurovegetativas, de forma semelhante às respostas eliciadas em um confronto com um predador. Os seguidores de Hess realizaram a exploração sistemática do sistema nervoso do gato, confirmando os achados descritos em 1943 e adicionando novas estruturas (amígdala e matéria cinzenta periaquedutal) de onde se pôde obter a reação de defesa afetiva por estimulação elétrica. Dessa forma, o hipotálamo medial, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal (MCP) foram agrupados hierarquicamente compondo o sistema cerebral de defesa (para uma revisão, ver DEAKIN; GRAEFF, 1991; BRANDÃO et al., 2003; HETEM; GRAEFF, 2003). Já o construto do sistema de inibição comportamental foi proposto inicialmente nos anos 60 pelo psicólogo britânico Jeffrey Gray, o qual postulava que a ansiedade seria devida à ativação do SIC por determinadas classes de estímulos ambientais (sinais de punição ou frustração, estímulos ameaçadores inatos e novidade), resultando na inibição comportamental, e aumento do nível de vigilância e atenção em animais de laboratório. Revisando uma extensa literatura sobre o efeito de lesões cerebrais e administração de drogas ansiolíticas, medidas em animais de laboratório sob diversas condições experimentais, Gray concluiu que as alterações comportamentais produzidas por lesão do sistema septo-hipocampal eram as que mais se aproximavam das produzidas por substâncias ansiolíticas clássicas. Dessa forma, propôs que o sistema septo-hipocampal seria o principal substrato neural do SIC e que

as drogas ansiolíticas aliviarão a ansiedade porque prejudicariam o seu funcionamento (GRAY, 1982).

Dentre as várias fontes de perigo com as quais animais podem se confrontar, podem ser citados confrontos com o predador ou com animais da mesma espécie em competições, estímulos ambientais tais como altura, iluminação, estímulos dolorosos e ambientes ou objetos desconhecidos. Frente a estes estímulos os animais geralmente utilizam uma de quatro estratégias defensivas comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão (ADAMS, 1979; MARKS, 1987; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). A decisão de escolha de uma particular estratégia leva em conta vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou ambiente.

Partindo dessa premissa, Robert e Caroline Blanchard, estudando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores, classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça, se potencial ou real (se real, distal ou proximal) (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1997). No primeiro nível, as estratégias observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, usando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. No segundo, foi observada fuga ou imobilidade (estímulo distal), e, no caso em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal, fuga ou luta defensiva.

Como já dito, embora o medo e a ansiedade sejam emoções correlatas, existem tentativas de se diferenciar os seus conceitos, levando-se em consideração que se tratam de diferentes entidades nosológicas. Nesse sentido, Blanchard et al. (1993) propuseram

que quando o estímulo ou a situação ameaçadora é real, os comportamentos desencadeados (fuga e luta) seriam representativos de medo, enquanto os representativos de ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras (BLANCHARD et al., 1993).

Gray e McNaughton (2000) publicaram a segunda edição do livro intitulado “A Neuropsicologia da ansiedade” (*The Neuropsychology of anxiety*), no qual procuraram revisar e integrar os construtos teóricos do SIC e do SCD, o que resultou em importantes mudanças conceituais, que serão brevemente apresentadas a seguir. À análise etoexperimental proposta pelo casal Robert e Caroline Blanchard, Gray e McNaughton (2000) adicionaram componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade. Esses autores também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e ansiedade. Assim, quando a situação permite aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação, os comportamentos observados (inibição comportamental e avaliação de risco) estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente as estratégias de defesa do tipo esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados com o medo.

Em suma, a principal função do sistema septo-hipocampal passou a ser a de detectar conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo. A primeira seria gerada no chamado “sistema de aproximação comportamental” (SAC) representado pelo sistema mesolímbico, que inclui estruturas organizadas hierarquicamente, como o núcleo acumbente, que é innervado principalmente pelo sistema dopaminérgico. A função desse sistema é incentivar a busca de fontes de satisfação de necessidades biológicas, como alimento, abrigo e sexo. Essa visão é

consistente com o envolvimento do SAC em situações apetitivas como na facilitação de processos de recompensa, omissão de punição e uma série de respostas que incluem a aproximação a fontes de sinais seguros (IKEMOTO; PANKSEPP, 1999) A segunda seria gerada no sistema de fuga/luta/congelamento (SFLC), representado por uma hierarquia de estruturas (representadas nos extremos do eixo rostrocaudal pelo córtex prefrontal e matéria cinzenta periaquedutal, respectivamente) que mediarão respostas de afastamento, como esquiva e fuga, de fontes de perigo inato ou aprendido. Quando uma situação induz ambas as tendências apresentadas acima pelo SAC e SFLC, configura-se o conflito do tipo aproximação-evitação, que ativaria o SIC, gerando ansiedade. É importante ressaltar que além do sistema septo-hipocampal, a amígdala também faz parte do substrato neural do SIC. Enquanto o primeiro estaria mais relacionado com o aspecto cognitivo da ansiedade (hesitação e dúvida) a amígdala contribuiria com os aspectos afetivos e neurovegetativos da ansiedade, na qual o SIC aumentaria o alerta (GRAY; McNAUGHTON, 2000). O papel do SIC pode então ser resumido como não só o de inibir o comportamento de evitação e aproximação, mas também de aumentar o alerta e a atenção, eliciando, por exemplo, comportamentos mediados pelo septo-hipocampo como a avaliação de risco, que compreende uma exploração vigorosa e extensiva para coletar informações necessárias para o equilíbrio do balanço a favor da aproximação (se a ameaça for percebida em menor magnitude do que inicialmente) ou a evitação (se a ameaça for percebida em maior magnitude, comparada à percepção inicial). A Figura 1 abaixo resume as entradas e saídas dos sistemas SFLC e SAC e sua relação com o SIC.

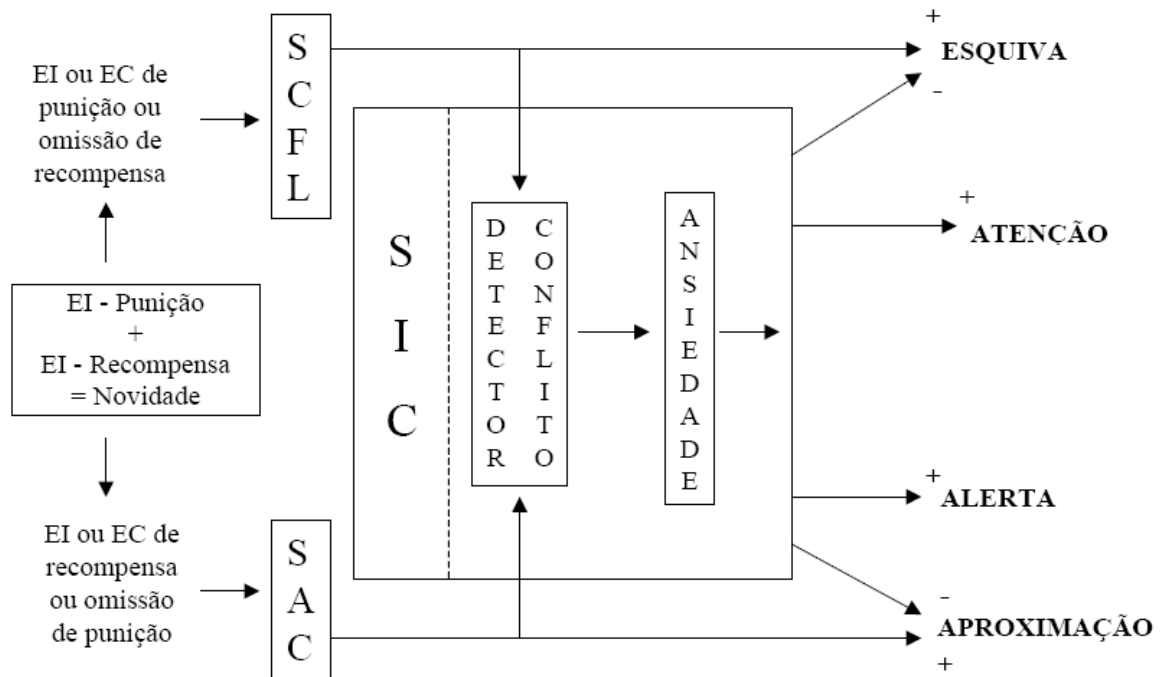


Figura 1. Relação entre estímulos, o sistema fuga/luta/congelamento (SFLC), o sistema aproximação comportamental (SAC) e o sistema de inibição comportamental (SIC). As entradas consistem de recompensas ou punições esperadas e omitidas, e estímulos inatos (EI) ou condicionados (EC) que predizem esses eventos. O conflito aproximação-avoidância consiste na ativação do SIC que é resultado da ativação simultânea SAC e SFLC. Modificado de McNaughton & Corr (2004).

Labirinto em cruz elevado (LCE)

A busca por modelos animais de ansiedade resultou no desenvolvimento do labirinto em cruz elevado, originalmente descrito em ratos por Pellow et al. (1985) e posteriormente validado em camundongos por Lister (1987). Sucintamente, o LCE é um aparelho usado para avaliar os níveis de ansiedade que roedores (exemplos, ratos e camundongos) exibem diante de uma situação aversiva, eliciada pelos braços abertos do aparelho. Os níveis de ansiedade são avaliados pela esquivas aos braços abertos (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), enquanto a atividade geral é avaliada pela frequência absoluta de entradas nos braços fechados (PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994). O LCE tem sido amplamente usado para *screening* de drogas e como auxílio para entender os mecanismos subjacentes aos comportamentos

relacionados à ansiedade (PELLOW et al., 1985; HANDLEY; MITHANI, 1984; RODGERS; COLE, 1994; LISTER, 1987). Roedores expostos ao LCE apresentam um aumento na exploração dos braços abertos após a administração de drogas ansiolíticas. Uma atenção considerável tem sido dispensada nas conseqüências de uma experiência prévia sobre as respostas farmacológicas observadas em uma nova exposição ao LCE. Em geral, é observada a perda do efeito ansiolítico de drogas e um aumento da esquivas aos braços abertos em animais reexpostos ao LCE, fenômeno que ficou conhecido como *one-trial tolerance (OTT)* (FILE, 1990). Várias hipóteses foram formuladas com o propósito de explicar esse fenômeno, como uma habituação da locomoção (DAWSON et al., 1994), mudança funcional no sítio de ligação de receptores (GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a, 2002b, 2003), sensibilização do estado de medo/ansiedade (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000), mudança qualitativa do estado emocional entre as exposições, de uma resposta de medo incondicionada a esquivas aprendida (HOLMES; RODGERS, 1998; DAL-CÓL et al., 2003; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003, 2004; FILE; ZANGROSSI, 1993), e/ou ativação de estruturas telencefálicas relacionadas à cognição, envolvidas no controle de respostas de medo de natureza aprendida (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008). Hipóteses como a apresentada por Dawson et al. (1994) são contrariadas por resultados que mostram uma persistência no aumento nos níveis de corticosterona plasmática em animais expostos e reexpostos ao LCE (FILE et al., 1994; RODGERS et al., 1999). De forma interessante, o fenômeno da OTT não ocorre exclusivamente no modelo do LCE, tendo sido descrito também para o teste de transição claro-escuro (HOLMES et al., 2001), teste de exposição ao odor de predador (MCGREGOR; DIELENBERG, 1999) e teste das quatro plataformas (HASCÖET; BOURIN; COUETOUX DU TERTRE, 1997).

Quanto à prevenção da OTT, tem sido demonstrado que roedores continuam a exibir um perfil comportamental compatível com o efeito ansiolítico de drogas numa reexposição quando (1) um novo conflito motivacional foi introduzido durante a tarefa (PEREIRA et al., 1999), (2) a duração da primeira exposição foi reduzida a 1 minuto (DAL-CÓL et al., 2003), (3) doses amnésicas de clordiazepóxido (FILE; MABUTT; HITCHCOTT, 1990), escopolamina (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004) ou propranolol (STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008) foram administradas antes da primeira exposição, (4) injeções sistêmicas de agonistas 5-HT_{2A} foram administradas antes da reexposição (observado no teste das 4 plataformas; RIPOL; HASCÖET; BOURIN, 2006) e (5) infusões intra-amígdala de agonistas e antagonistas de receptores benzodiazepínicos foram conduzidas antes da reexposição (BARBALHO; CANTO-DE-SOUZA; NUNES-DE-SOUZA, 2009). Além disso, estudos conduzidos com o objetivo de elucidar as estruturas encefálicas do sistema de defesa que poderiam modular a ineficácia de ansiolíticas na reexposição ao LCE tem mostrado que a inativação da amígdala basolateral (antes da primeira exposição), hipotálamo dorsomedial (antes da reexposição) e matéria cinzenta periaquedutal (antes da reexposição, mas não após a primeira exposição) reinstalaram os efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998, 1999; BERTOGLIO et al. 2005). Embora poucos estudos tenham investigado a participação de estruturas encefálicas no fenômeno da OTT, esses achados sugerem que a mudança qualitativa na estratégia defensiva adotada por animais com experiência no LCE é acompanhada de mudanças na hierarquia de estruturas recrutadas nas duas condições. Nesse sentido, os resultados com a inativação da MCP obtidos por Bertoglio e Carobrez (2005) levaram os autores a sugerirem que os mecanismos pelos quais o LCE tem validade de predição a drogas ansiolíticas, em uma primeira exposição, se devem ao conflito do tipo

aproximação-avoidância, representados pela “curiosidade” e “precaução”, respectivamente, produzidas pela novidade (HANDLEY; McBLANE, 1993). Nesse contexto, drogas ansiolíticas modificam o balanço do conflito, de avoidância para aproximação (GRAY; McNAUGHTON, 2000). Porém, como já foi ressaltado anteriormente, a tendência à aproximação e à avoidância de um estímulo resulta, sobretudo da experiência com o estímulo em questão. Dessa maneira, Bertoglio e Carobrez (2004) sugerem que o fenômeno OTT representa que o conflito aproximação-avoidância não está mais presente na segunda exposição ao LCE.

Gray e McNaughton (2000), por exemplo, enfatizaram que a ansiedade ocorre quando o animal se aproxima da fonte de perigo, uma característica do conflito aproximação-avoidância. O medo, por outro lado, ocorre quando há o componente de fuga-esquiva. De fato, McNaughton e Corr (2004) propuseram que estruturas encefálicas que modulam medo e ansiedade estão diferentemente representadas no sistema defensivo (embora sobreposições ocorram), com a ansiedade tendo uma maior representação em estruturas rostrais e corticais (ex. porções dorsais do córtex prefrontal, cíngulo posterior, sistema septo-hipocámpal, amígdala) enquanto o medo é representado por estruturas mais caudais, como a matéria cinzenta periaquedutal e hipotálamo dorsomedial. Em conjunto, esses dados suportam um papel importante da MCP, amígdala e hipotálamo dorsomedial no estado emocional induzido pela reexposição ao LCE.

Teste de exposição ao rato

O teste de exposição ao rato (TER) é um modelo animal de ansiedade recentemente desenvolvido no laboratório de Robert e Caroline Blanchard, que se

baseia na interação presa-predador (YANG et al., 2004). O modelo consiste num compartimento dividido em duas partes, sendo o predador confinado em um lado e, separado por uma tela, a presa do outro lado pode explorar livremente a área adjacente (superfície) ou esquivar-se numa toca que é interligada à superfície através de um túnel. Diferentemente de modelos como *Mouse Defense Test Battery*, no qual um camundongo é perseguido por um rato anestesiado conduzido por um experimentador o modelo do TER permite que a presa escolha afastar-se ou aproximar-se do predador, e se destaca pela marcante avaliação de risco exibida por camundongos sobretudo no túnel. Ratos são predadores de camundongos tanto na natureza como em laboratório (O'BOYLE 1974, 1975; CALVO-TORRENT; BRAIN; MARTINEZ, 1999; ANISMAN et al., 2001). Quando confrontados com ratos, camundongos selvagens ou de laboratório exibem claras respostas defensivas (BLANCHARD et al., 1998). Os estudos conduzidos em nosso laboratório com o modelo até o momento têm mostrado que a exposição de camundongos a ratos aumenta os níveis de corticosterona plasmática (ainda não publicados) e resulta numa maior marcação de Fos em estruturas hipotalâmicas claramente envolvidas com ameaça predatória (MARTINEZ et al., 2008). Ainda, já foi demonstrada a participação de receptores de CRF (CARVALHO-NETTO et al., 2007; LITVIN et al., 2007), e do sistema glutamato-óxido nítrico da MCP (CARVALHO-NETTO et al., 2009) nas respostas defensivas de camundongos confrontados com ratos no TER.

Matéria Cinzenta Periaquedutal e Serotonina

A matéria cinzenta periaquedutal é uma estrutura que circunda o aqueduto mesencefálico e que de acordo com critérios citoarquitetônicos e funcionais foi

subdividida ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas, denominadas como dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (BEITZ, 1985; CARRIVE, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994). Os primeiros estudos direcionados a essa estrutura datam da década de 30, e concentraram-se em determinar a participação da MCP no processamento de informação nociceptiva ascendente (MAGOUN et al., 1937). Além do processamento e modulação da dor, sabe-se que a MCP está envolvida ainda com regulação autonômica, comportamento sexual (lordose), comportamento maternal, medo e ansiedade, vocalização e comportamento predatório (para uma revisão ver BEHBEHANI, 1995). De fato, a localização neuroanatômica e abundantes conexões aferentes e eferentes com áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (MANTHY, 1982; BEITZ, 1990; BANDLER; CARRIVE; ZHANG, 1991; CANTERAS; SWANSON, 1992; CANTERAS, 2002; SEWARDS; SEWARDS, 2002) confere a MCP um papel importante na modulação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo.

Nashold e colaboradores (1969), ao fazerem estimulações elétricas do mesencéfalo de pacientes de neurocirurgia, reportaram que a estimulação da MCP produzia uma sensação de queimação, vibração, movimentos oculares e medo intenso. Na mesma ocasião, Reynolds (1969) reportou que a estimulação da MCP de ratos produzia uma analgesia de alta magnitude que inclusive permitia a realização de procedimentos cirúrgicos sem a necessidade de anestésicos. Após essa última descoberta, o fato de que a estimulação dessa estrutura produzia respostas aversivas foi ignorada por muitos investigadores, sendo retomada na década de 80 (para uma revisão, ver BEHBEHANI, 1995). Vários neurotransmissores na MCP foram investigados quanto as suas propriedades antiaversivas ou próaversivas, dos quais cabe destaque a serotonina.

Deakin e Graeff (1991) propuseram que a serotonina possui um papel dual na modulação de diferentes tipos de emoção como o medo e ansiedade, cada qual envolvendo determinados subtipos de receptores em estruturas especificamente relacionadas com esses diferentes estados emocionais. Embora existam evidências comportamentais, farmacológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas implicando a serotonina na modulação da ansiedade, a natureza precisa deste envolvimento tem sido obscurecida por resultados inconsistentes (CHOPIN; BRILEY, 1987; GARDNER, 1986; GRIEBEL, 1995; HANDLEY, 1995; IVERSEN, 1984). A maior parte das discrepâncias envolvendo a participação da 5-HT na modulação da ansiedade encontra explicações na forma de administração das drogas agonistas e antagonistas, sítio de injeção (injeção sistêmica ou intracerebral), modelo animal utilizado, espécie utilizada, e outros fatores tais como seletividade da droga e ação em sítios pré e pós-sinápticos (por ex., FILE; GONZALEZ; ANDREWS, 1996; CANTO-DE-SOUZA, NUNES-DE-SOUZA; RODGERS, 2002; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002).

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que infusões de WAY-100635, um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} no núcleo mediano da rafe (NMR), promoveram um efeito antiaversivo em camundongos expostos ao LCE (CANTO-DE-SOUZA, NUNES-DE-SOUZA; RODGERS, 2002). Segundo os autores, uma vez que o WAY-100635 aumenta o disparo de neurônios da rafe por bloquear os autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos (FORNAL et al., 1996; HAJÓS et al., 2001; MUNDEY; FLETCHER; MARSDEN, 1996), tais efeitos são provavelmente devidos a uma desinibição da liberação de serotonina em sítios pós-sinápticos (hipocampo, amígdala e MCP). Evidência de que o efeito ansiolítico do WAY-100635 no MNR não se deve a uma facilitação da neurotransmissão serotoninérgica em receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT₂ do

hipocampo ou amígdala encontram suporte na literatura, uma vez que tais ações foram reportadas como sendo ansiogênicas em ratos (ALVES et al., 2004; CRUZ et al., 2005) e camundongos (CONÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007; FACHINI et al., 2004; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002). No entanto, o NMR também faz projeções para a MCP (VERTES FORTIN; CRANE, 1999), a qual possui altas densidades de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂ (CLEMENTS et al., 1985; BEITZ et al., 1986; LOVICK et al., 2000; BRANDÃO; LOPEZ-GARCIA; ROBERTS, 1991; LOVICK, 1993; GRIFFITHS; LOVICK, 2002) e na qual a facilitação da transmissão serotoninérgica na maior parte dos estudos em ratos produz efeitos antiaversivos (para revisões, ver DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF et al., 1996; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; GRAEFF, 2002, 2004). De fato, essa hipótese encontra suporte em resultados recentes publicados por Nunes-de-Souza e colaboradores (2008), nos quais a microinfusão intra-MCP do agonista de receptores 5-HT₂ mCPP atenuou a ansiedade de camundongos expostos ao LCE.

É importante ressaltar, contudo, que nos trabalhos de Canto-de-Souza, Nunes-de-Souza e Rodgers (2002) e Nunes-de-Souza, Canto-de-Souza e Rodgers (2002), a experiência da exposição prévia de camundongos ao LCE aboliu os efeitos ansiolíticos do antagonista 5-HT_{1A} injetados intra-NMR e intra-hipocampo ventral, respectivamente. Todavia, em nenhum dos dois estudos os animais receberam injeção de salina ou WAY-100635 durante a primeira exposição no LCE. Ainda, no estudo de Nunes-de-Souza et al. (2008) as consequências de uma experiência prévia no LCE sobre os efeitos ansiolíticos do mCPP na MCP não foram investigadas. Dessa forma, a participação dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na modulação dos estados emocionais induzidos pela exposição e reexposição ao LCE necessita ser investigada. Finalmente, uma vez que a reexposição ao LCE pode levar a um estado emocional mais defensivo (ex. menor

exploração nos braços abertos), sobretudo pelo fato de que experiência prévia ao aparelho permite ao animal identificar a ameaça proximal já no início da reexposição, torna-se relevante investigar se os eventuais efeitos antiaversivos provocados pela injeção intracerebral de agonistas serotoninérgicos na reexposição ao LCE são também observados em outro teste de ansiedade com características aversivas iminentes, como o teste de exposição ao rato (TER).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O desenvolvimento do trabalho se deu em 3 etapas distintas, a saber:

ETAPA A:

- Investigar se juntamente com a experiência no LCE a experiência prévia com benzodiazepínicos é capaz de reinstalar os efeitos ansiolíticos do tratamento sistêmico com diazepam no reteste;
- Avaliar os níveis de corticosterona plasmática de camundongos submetidos ao teste e reteste no LCE;

ETAPA B:

- Investigar os efeitos de microinjeções intra-MCPd pré-exposição 1 e pré-exposição 2 de agonistas serotoninérgicos (8-OH-DPAT: agonista 5-HT_{1A}; DOI: agonista 5-HT_{2A/2C} e MK-212: agonista 5-HT_{2C}) sobre o comportamento de camundongos submetidos ao paradigma do teste e reteste no LCE;
- Avaliar o efeito de antagonistas serotoninérgicos administrados sistemicamente previamente aos agonistas intra-MCPd para caracterização dos subtipos de receptores envolvidos em efeitos antiaversivos na reexposição de camundongos no labirinto em cruz elevado.

ETAPA C:

- Avaliar os efeitos do agonista 5-HT_{2A/2C} DOI intra-MCPd no comportamento de camundongos submetidos a um modelo de interação presa-predador, o teste de exposição ao rato.

ETAPA A

EXPERIMENTO 1: Efeito do tratamento sistêmico com diazepam no teste e reteste em camundongos no labirinto em cruz elevado

O primeiro experimento da Etapa A consistiu na caracterização do fenômeno da *one-trial tolerance* através da avaliação dos efeitos da administração do fármaco diazepam sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado. Essa etapa encontra justificativa no fato de que poucas são as publicações acerca da OTT cujo protocolo experimental envolveu administração de fármacos ansiolíticos em ambas as exposições ao LCE. Dentre esses estudos, apenas Barbalho, Nunes-de-Souza e Canto-de-Souza (2009) utilizaram camundongos. Essa abordagem é importante uma vez que os estudos conduzidos com lesões de estruturas (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998, 1999; BERTOGLIO et al. 2005) ou administração de drogas amnésicas pré-teste ou pós-teste (FILE; MABUTT; HITCHCOTT, 1990; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008) sugerem que a reinstalação dos efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos no reteste no LCE se dá devido a um prejuízo na evocação da memória aversiva adquirida na primeira exposição ao aparato. De fato, a administração de drogas pós-teste em doses capazes de aumentar a retenção de memória (anfetamina e pentilenotetrazol) facilitam a ocorrência da OTT (VARGAS; CUNHA, ANDREATINI, 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos: foram utilizados camundongos Suíços adultos machos (23-33g), albinos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram alojados em grupos de 10 (gaiola: 45 x 28 x 13 cm), mantidos sob o ciclo

claro/escuro de 12 horas (luzes acesas: 07:00h), em um ambiente com temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) controladas, por pelo menos uma semana antes dos testes (idade no teste: 10-12 semanas). Alimento e água eram disponíveis *ad libitum*, exceto durante as breves sessões de teste.

Drogas: Diazepam (7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona Roche, Brasil) foi dissolvido em salina acrescida de Tween-80 a 2%. A dose de 2 mg/Kg foi baseada em estudos anteriores (NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2000; RODGERS; LEE; SHEPHERD, 1992). Todas as soluções foram preparadas no mesmo dia ou no dia anterior ao experimento.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE): O LCE é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de acrílico (assoalho de madeira e paredes transparentes) e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos por uma plataforma central comum (5 x 5), e elevado 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Figura 2).

Cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento para ambientação. Trinta minutos após receberem a injeção i.p. de diazepam ou veículo, os camundongos foram então transportados com auxílio de uma gaiola individual até a sala experimental aonde foram expostos ao LCE. Cada animal foi colocado sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e pôde explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (1 x 60 W, 55 lux no assoalho da plataforma central). O teste foi gravado através de um circuito filmadora-TV-DVD para análise posterior. Após 24

horas (reteste), os animais foram realocados em outros grupos de acordo com o tratamento recebido pré-exposição 1 (teste), como ilustrado a seguir: veículo/veículo, veículo/diazepam, diazepam/veículo, diazepam/diazepam.

Análise comportamental: Os comportamentos foram avaliados pela análise dos DVDs com o auxílio do programa X-plorat 3.0, desenvolvido pelo grupo do Prof. Silvio Morato da USP de Ribeirão Preto (não publicado). Os comportamentos analisados envolveram os parâmetros convencionais: frequência de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Esses dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$).

Estatística: Os resultados das sessões completas no LCE foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores (tratamento e dia do teste) seguidas por testes de comparações múltiplas de Duncan. Adicionalmente cada sessão também foi submetida à análise de variância de um fator (tratamento). A análise dos dados minuto-a-minuto das sessões no LCE foram submetidos a (ANOVA) de dois fatores (tratamento tempo) seguidas por testes de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de p iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos.



Figura 2. Labirinto em cruz elevado para camundongos.

RESULTADOS

A Figura 3 ilustra a frequência de entradas nos braços fechados do durante 5 minutos de exposição ao LCE no teste e reteste.

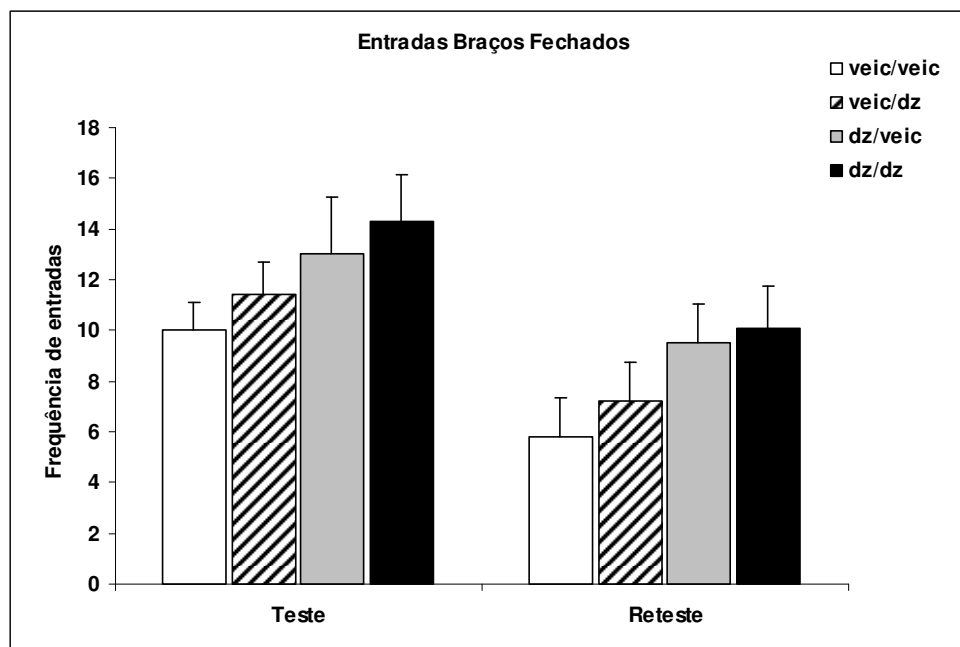


Figura 3: Frequência total de entradas nos braços fechados (BF) do LCE durante os 5 minutos do teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos i.p. (veic: veículo; dz: diazepam 2mg/Kg) recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Barras: média \pm EPM. N=10/grupo.

A ANOVA de 2 fatores acusou efeito de tratamento e dia do teste [$F(3,36)=2,88$ e $F(1,36)=11,45$, respectivamente. $P<0,05$] mas não houve interação entre os fatores [$F(3,36)=0,99$, $p>0,05$]. O teste de Duncan para o fator tratamento confirmou uma redução no número de entradas para o grupo que recebeu diazepam pré-exposição 1 e pré-exposição 2 em comparação ao grupo veículo/veículo ($p<0,05$). Já para o fator dia do teste foi confirmada uma redução no número de entradas no reteste. As análises de variância de um fator intra-exposição e intra-exposição 2 não mostraram efeitos significativos do tratamento sobre o número de entradas nos braços fechados [$F(3,36)=1,20$; $F(3,36)=1,60$, respectivamente. $P>0,05$]. As Figuras a seguir (figura 4) detalham o número de entradas nos braços fechados do LCE numa análise minuto-a-minuto.

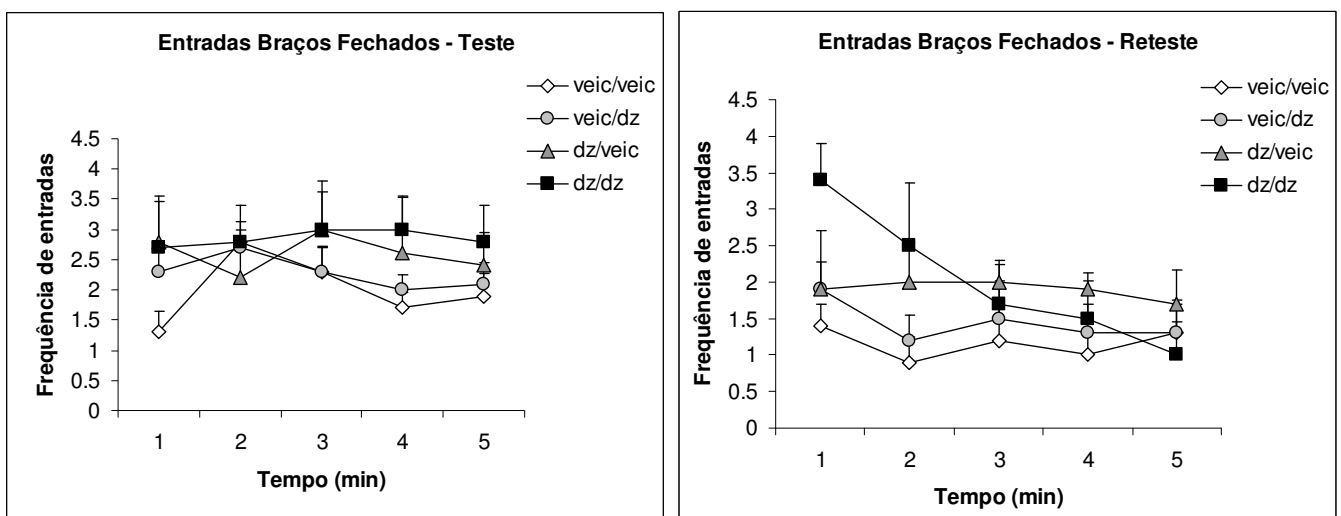


Figura 4: Frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE minuto-a-minuto no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos i.p. (veic: veículo; dz: diazepam 2mg/Kg) recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=10/grupo.

A ANOVA de dois fatores para ambas as exposições não acusou quaisquer diferenças para os fatores analisados [**Teste:** fator tratamento $F(3,36)=1,20$; fator tempo

$F(4,144)= 0,59$; interação $F(4,144)=0,55$; **Reteste**: fator tratamento $F(3,36)=0,20$; fator tempo $F(4,144)= 0,053$; interação $F(4,144)=0,28$; $p>0,05$].

Os índices de ansiedade registrados durante as exposições ao teste e reteste são representados nas Figuras a seguir (Figuras 5 e 6).

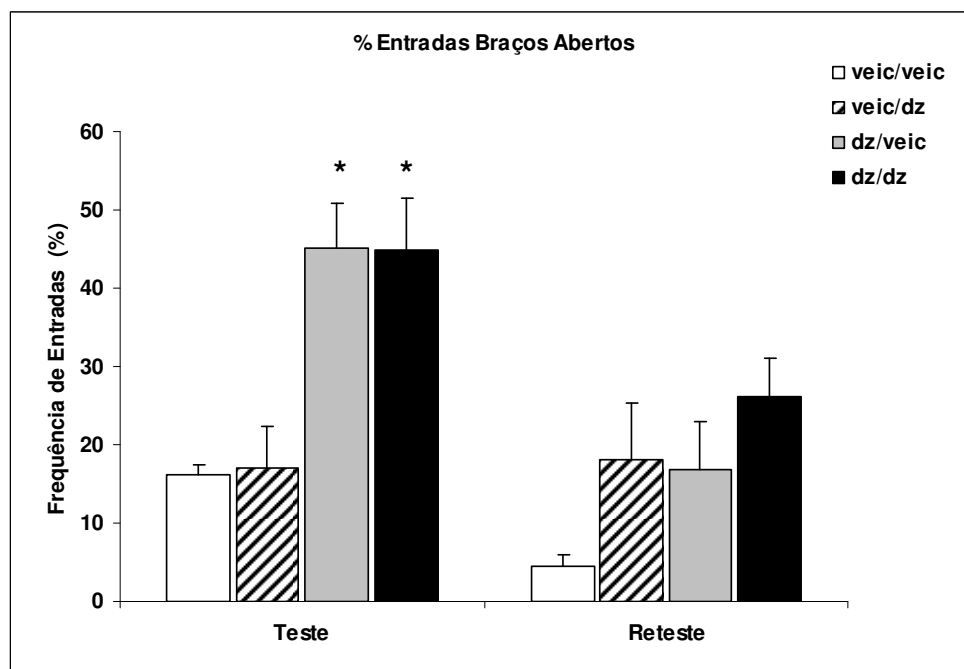


Figura 5: Porcentagem de entradas nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos recebidos i.p. (veic: veículo; dz: diazepam 2mg/Kg) previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. $N=10$ /grupo. * $p<0,05$ versus grupos veic/veic e veic/dz no teste.

A ANOVA bifatorial para porcentagens de entradas nos braços abertos demonstrou significância para todos os fatores [tratamento: $F(3,36)=5,35$; dia do teste: $F(1,36)=30,78$; interação: $F(3,36)=5,67$; $P<0,05$). O teste de Duncan confirmou uma menor exploração dos braços abertos do LCE na segunda exposição ($p<0,05$) e uma maior porcentagem de entradas para os grupos diazepam/veículo e diazepam/diazepam em comparação aos demais ($p<0,05$). Uma análise intra-dia para o fator tratamento com

ANOVA unifatorial revelou significância no dia do teste [$F(3,36)=7,9$, $p<0,05$] e um valor de p próximo da significância para o reteste [$F(3,36)=2,63$, $p=0,06$]. O teste Post hoc de Duncan confirmou uma maior exploração dos braços abertos no primeiro dia de exposição para os grupos diazepam/veículo e diazepam/diazepam em comparação aos demais ($p<0,05$).

Já para a análise envolvendo a porcentagem de tempo gastos nos braços abertos do LCE, a ANOVA demonstrou significância para todos os fatores [tratamento: $F(3,36)=7,23$; dia do teste: $F(1,36)=36,90$; interação: $F(3,36)=6,47$; $P<0,05$]. O teste de Duncan, de maneira semelhante à descrita para porcentagem de entradas nos braços abertos, também confirmou uma diminuição na segunda exposição comparada a primeira ($p<0,05$), sendo os grupos diazepam/veículo e diazepam/diazepam aqueles que mais exploraram os braços abertos comparados aos demais ($p<0,05$). Na análise com ANOVA unifatorial enquanto demonstram-se valores significantes de P para fator tratamento no dia do teste [$F(3,36)=10,1$, $p<0,05$], nenhum efeito fora detectado para o reteste [$F(3,36)=1,86$, $p>0,05$]. Corroborando os resultados obtidos com porcentagens de entradas, os grupos diazepam/veículo e diazepam/diazepam passaram mais tempo explorando os braços abertos do LCE se comparados aos demais grupos ($p<0,05$).

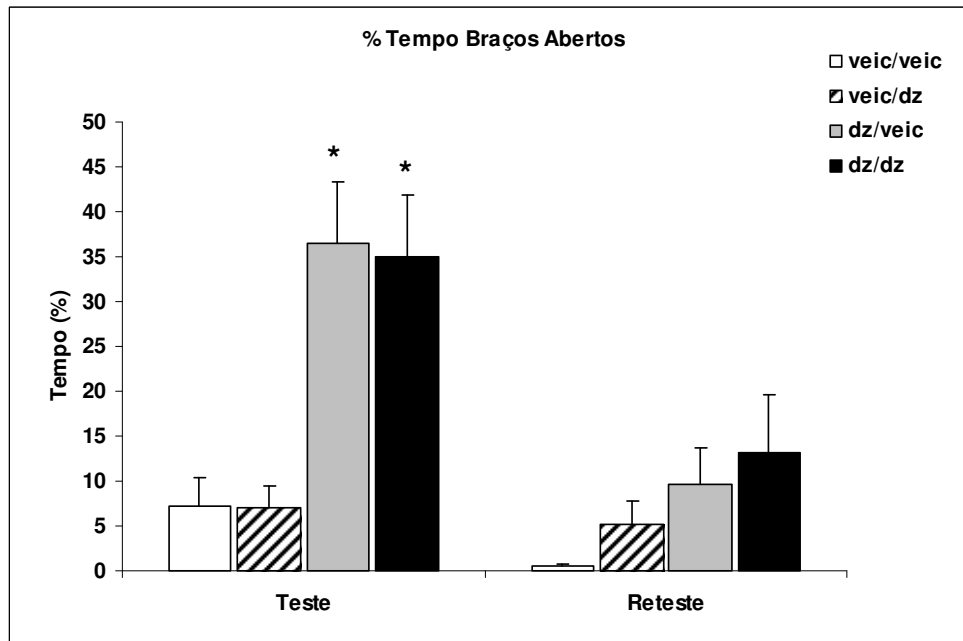


Figura 6: Porcentagem de entradas nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos i.p. (veic: veículo; dz: diazepam 2mg/Kg) recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=10/grupo. * $p < 0,05$ versus grupos veic/veic e veic/dz no teste.

As Figuras a seguir detalham os índices de ansiedade no LCE numa análise minuto-a-minuto.

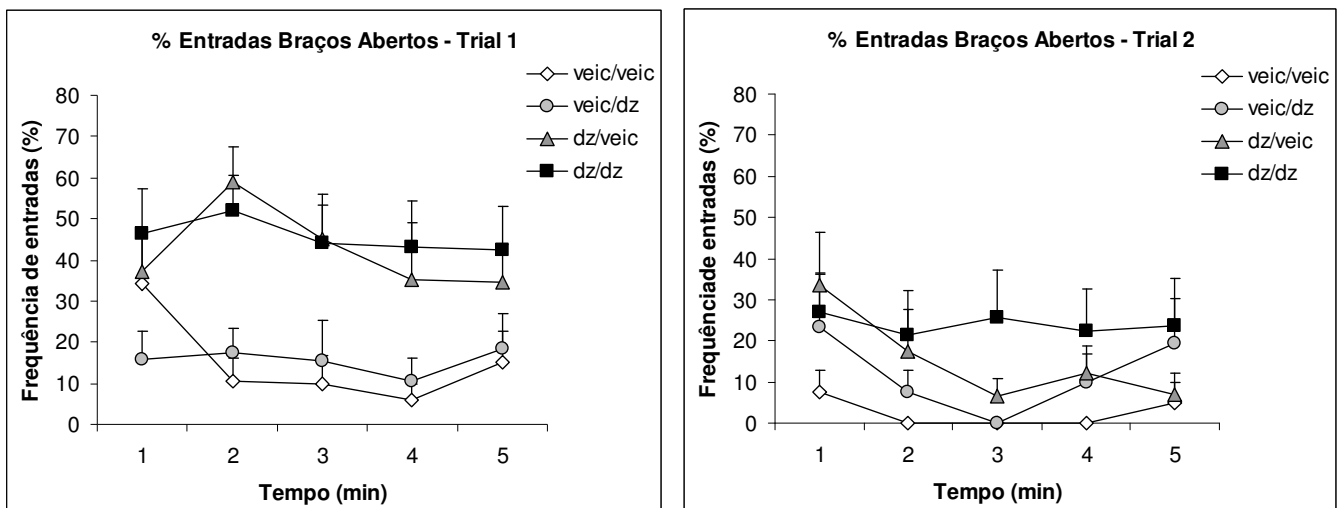


Figura 7: Porcentagens de entradas nos braços abertos (BA) do LCE minuto-a-minuto no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos i.p. (veic: veículo; dz: diazepam 2mg/Kg) recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=10/grupo.

A ANOVA de dois fatores revelou significância apenas para o fator tratamento no teste e para o fator tempo no reteste [**Teste:** fator tratamento $F(3,36)=7,22$, $p<0,05$; fator tempo $F(4,144)=1,41$, $p>0,05$; interação $F(4,144)=1,00$, $p>0,05$; **Reteste:** fator tratamento $F(3,36)=2,79$, $p=0,05$; fator tempo $F(4,144)=2,58$, $p<0,05$; interação $F(4,144)=0,69$; $p>0,05$]. A análise post hoc no teste confirmou uma maior exploração dos braços abertos pelos grupos diazepam/veículo e diazepam/diazepam ($p<0,05$); já para o reteste, a análise post hoc demonstrou uma maior porcentagem de entradas nos braços abertos no primeiro minuto da exposição em comparação aos demais ($p<0,05$), com exceção do quinto minuto ($p=0,06$).

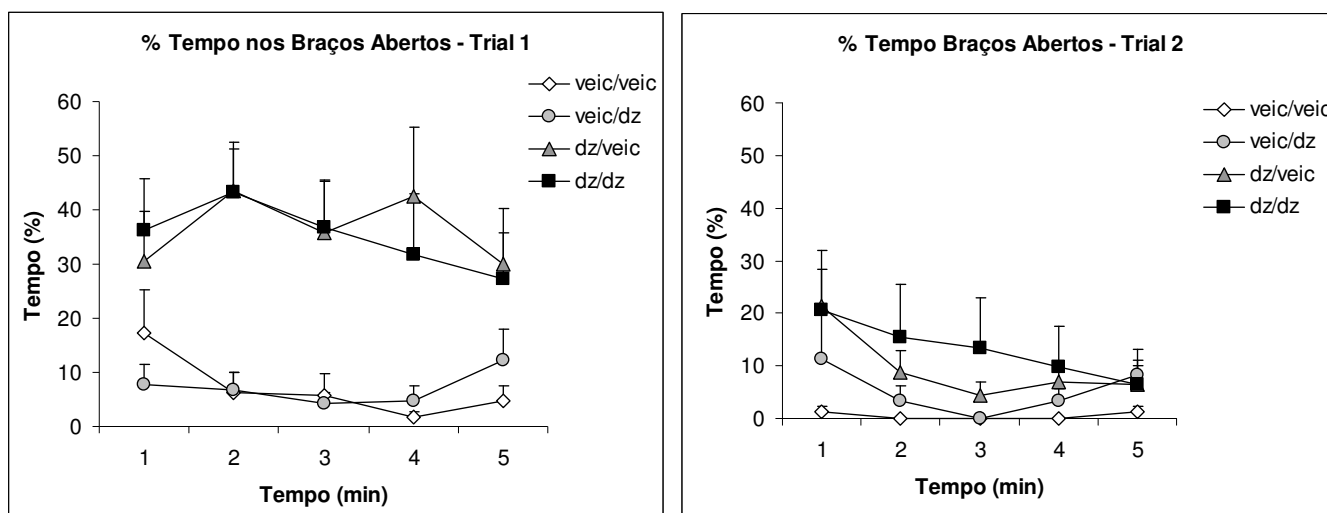


Figura 8: Porcentagens de tempo nos braços abertos (BA) do LCE minuto-a-minuto no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos i.p. (veic: veículo; dz: diazepam 2mg/Kg) recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=10/grupo.

Semelhante ao resultado da análise estatística para porcentagem de entradas nos braços abertos, da mesma forma ANOVA bifatorial para porcentagem de tempo minuto-a-minuto revelou significância apenas para o fator tratamento no teste e para o fator tempo no reteste [**Teste:** fator tratamento $F(3,36)=10,1$, $p<0,05$; fator tempo $F(4,144)=0,67$, $p>0,05$; interação $F(4,144)=0,86$, $p>0,05$; **Reteste:** fator tratamento $F(3,36)=1,86$,

$p > 0,05$; fator tempo $F(4,144) = 3,25$, $p < 0,05$; interação $F(4,144) = 0,76$; $p > 0,05$]. A análise Post hoc no teste confirmou uma maior exploração dos braços abertos pelos grupos diazepam/veículo e diazepam/diazepam ($p < 0,05$); já para o reteste, a análise Post hoc demonstrou uma maior porcentagem de entradas nos braços abertos no primeiro minuto da exposição em comparação aos demais ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO 2: Curva de corticosterona plasmática em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.

Haja vista que alguns estudos questionam a aversividade de exposições sucessivas ao LCE (DAWSON et al., 1994), o Experimento 2 teve como objetivo investigar o perfil da secreção de corticosterona, um marcador biológico de estresse (para revisões ver KORTE, 2001; HERMAN et al., 2005), em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos: a descrição dos sujeitos utilizados no atual experimento é idêntica àquela já descrita no Experimento 1, vide página 29.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE): o aparato utilizado é o mesmo descrito para o Experimento 1 na página 30. Cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento para ambientação. Os camundongos foram então transportados, com auxílio de uma gaiola individual, até a sala experimental, aonde foram expostos ao LCE. Cada animal foi colocado sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e pôde explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Os testes foram conduzidos durante a fase clara

do ciclo de luz, entre 8:00h e 12:00h, em uma sala com baixa iluminação (1 x 60 W, 55 lux no assoalho da plataforma central). Ao final da exposição, os animais retornaram a sala adjacente à sala experimental, aonde foram mantidos por 15, 30 ou 60 minutos. Passados esse períodos os animais foram levados a uma outra sala experimental aonde sofreram decapitação por guilhotina para coleta do sangue do tronco em tubos de polipropileno previamente heparinizados. Após 24 horas, o procedimento foi repetido para os animais que foram apenas expostos ao LCE no dia anterior. Além disso, animais que não sofreram exposição ao LCE também foram incluídos no experimento a fim de verificar os níveis basais de corticosterona plasmática.

Radioimunoensaio para corticosterona: O radioimunoensaio para determinação da corticosterona plasmática foi conduzido de acordo com a descrição de Marin, Cruz e Planeta (2007). O sangue foi centrifugado a 2000g por 10 minutos para separação do plasma. Em seguida, 20µL de plasma foram diluídos 50 vezes em tampão salina-fosfato (PBS) 0,01M em tubos de polipropileno que foram colocados em banho maria a 75 °C por 1 hora para inativação por calor das globulinas de ligação a corticosterona. Após esse período 100 µL de uma solução contendo anticorpo anti-corticosterona (Sigma, St. Louis, MO) e corticosterona triciada [(3H)-corticosterone; New England Nuclear, Boston, MA) foi adicionada a cada amostra, que foi homogeneizada e incubada *overnight* a 4 °C. 500 µL de uma solução de carvão ativado e dextran foram adicionados as amostras a fim de adsorver a fração livre de corticosterona após a incubação. Os tubos foram centrifugados a 2000g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para *vials* contendo líquido de cintilação. A radioatividade foi quantificada por espectrometria líquida de cintilação. As curvas padrão empregadas continham 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 pg/100 µl (triplicatas) de corticosterona (Sigma). Após a

diluição, todas as concentrações de corticosterona das amostras coadunaram com a linearidade da curva padrão. O limite de detecção foi de 0,04 $\mu\text{g/dL}$ e a variação intra e inter-ensaio foram de 4,0% e 7,2%, respectivamente.

Estatística: Os resultados das mensurações da corticosterona plasmática após exposição ao LCE foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores (tempo e dia do teste) seguidas por testes de comparações múltiplas de Duncan. Adicionalmente cada sessão também foi submetida à análise de variância de um fator (tempo). Os valores de p iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos.

RESULTADOS

A Figura 9 ilustra a curva de secreção de corticosterona em grupos independentes de camundongos não expostos (Basal) ou expostos ao teste e reteste no LCE.

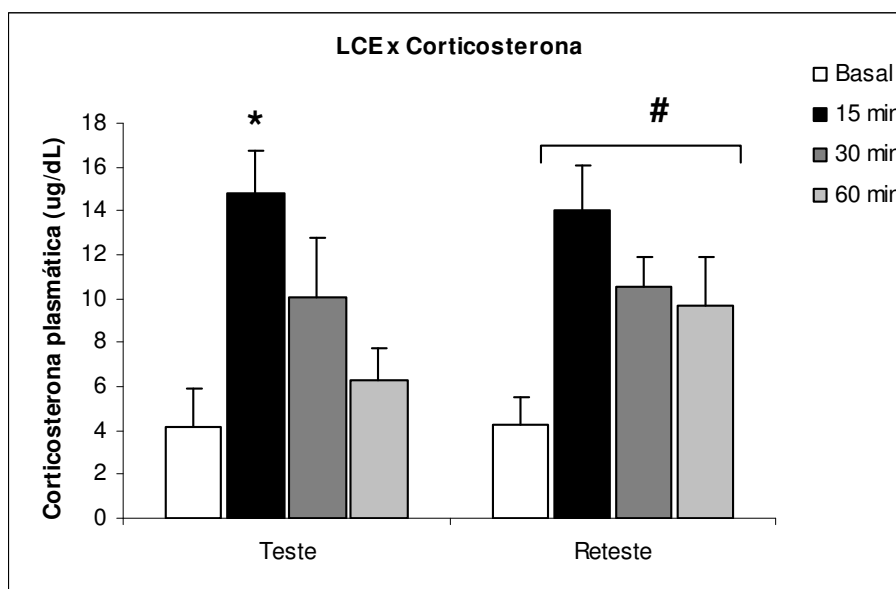


Figura 9: Concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) em animais expostos ao LCE durante os 5 minutos do teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tempos de coleta de amostra de sangue após as exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Barras: média \pm EPM.

N=6-10/grupo. * $p < 0,05$ versus grupos basal e 60 minutos no teste; # $p < 0,05$ versus grupo basal no reteste.

A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator dia do teste [$F(3,38)=9,48$, $p < 0,05$] mas não para tempo [$F(1,38)=0,33$, $p > 0,05$] ou interação dia do teste versus tempo [$F(3,38)=0,46$, $p > 0,05$]. O teste post hoc de Duncan confirmou aumentos significativos dos níveis de corticosterona plasmática nos tempo 15 e 30 minutos comparados ao grupo basal ($p < 0,05$), independentemente do dia do teste. Uma análise intra-dia com ANOVA unifatorial revelou diferenças significativas tanto para o dia do teste [$F(3,19)=5,21$, $p < 0,05$] como para o reteste [$F(3,19)=4,66$, $p < 0,05$]. O teste de Duncan na primeira exposição confirmou um incremento dos níveis de corticosterona para o grupo 15 minutos em comparação ao grupo basal e 60 minutos ($p < 0,05$), enquanto no reteste a mesma análise confirmou aumentos na corticosterona plasmática de todos os grupos em relação ao grupo basal ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no experimento com diazepam evidenciaram um claro efeito ansiolítico demonstrado pelo aumento da exploração dos braços abertos do LCE. Esse padrão não foi mantido em animais com experiência prévia no aparelho e que receberam diazepam na segunda exposição, confirmando vários resultados na literatura acerca da ineficácia de benzodiazepínicos nessas condições (FILE, 1990; para uma revisão, ver CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), um fenômeno conhecido como *one-trial tolerance (OTT)*.

A análise minuto-a-minuto realizada no experimento com diazepam corrobora outros resultados na literatura (para uma revisão ver CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) mostrando que em geral a exploração dos braços abertos do aparelho é maior no primeiro minuto de exposição e que os níveis de exploração numa segunda exposição ao aparelho são semelhantes aos minutos finais da primeira exposição. O desenho experimental que envolveu a administração repetida de diazepam pré-teste e pré-reteste teve como objetivo investigar a dependência de estado, isto é, se um possível efeito do fármaco no reteste depende do “drug state” no teste. Embora na maior parte das publicações que investigaram o fenômeno da *one-trial tolerance* o protocolo experimental tenha empregado tratamentos farmacológicos apenas antes da reexposição, alguns autores já reportaram que o mesmo tratamento no teste reinstalou o efeito ansiolítico do fármaco em questão na reexposição (FILE; MABUTT; HITCHCOTT, 1990; ESCARABAJAL; TORRES; FLAHERTY, 2003). É importante considerar, contudo, que no estudo de File e colaboradores (1990), uma dose amnésica de clordiazepóxido foi utilizada na primeira exposição. De maneira interessante, no estudo de McGregor e Dielenberg (2001), o efeito ansiolítico do midazolam numa segunda

exposição ao odor de gato foi reinstalado quando os animais receberam o benzodiazepínico na primeira exposição. No presente trabalho, a administração repetida de diazepam antes da primeira e segunda exposição não foi capaz de reinstalar o efeito ansiolítico no reteste. No entanto, é importante considerar que a análise estatística revelou um efeito do tratamento muito próximo da significância para porcentagem de entradas nos braços abertos no reteste. Provavelmente, uma análise post hoc confirmaria diferenças entre os grupos diazepam-diazepam e veículo-veículo.

Ainda, os aumentos nos níveis de corticosterona plasmática, um marcador endócrino de estresse (para revisões ver KORTE, 2001; HERMAN et al., 2005), corroboram a hipótese de que exposições subsequentes ao LCE são aversivas (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993, BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; HOLMES; RODGERS, 1998; DAL-CÓL et al., 2003; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003, 2004; FILE; ZANGROSSI, 1993) e contrariam outras que apontam que a OTT seja resultante da habituação da atividade locomotora em exposições repetidas ao aparelho (DAWSON et al., 1994). De fato, a magnitude da resposta do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal parece ser maior no reteste, uma vez que o aumento nos níveis de corticosterona plasmática persistiu após o pico (15 minutos) até a medida final, aos 60 minutos após a reexposição, contrastando com a primeira exposição, a qual induziu aumentos nos níveis de corticosterona somente aos 15 minutos após o teste. Haja vista que alguns estudos sugerem que a velocidade da recuperação dos níveis basais de corticosterona após um evento estressor está diretamente relacionada com a intensidade do estímulo estressor (GARCÍA et al., 2000; MÁRQUEZ; BELDA; ARMÁRIO, 2002; para uma revisão ver ARMÁRIO, 2006), os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a mudança qualitativa de estado emocional consiste numa sensibilização do estado de medo/ansiedade (HOLMES; RODGERS, 1998; DAL-CÓL et al., 2003;

BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003, 2004; FILE; ZANGROSSI, 1993). A natureza precisa da relação entre a relação do eixo HPA e a OTT ainda necessita ser apurada, uma vez que enquanto alguns estudos mostram que glicocorticóides podem potencializar a formação de memória (ROOZENDAAL, 2000), outros apontam que a administração de metirapona, um inibidor da síntese de glicocorticóides, não bloqueou o aumento na esquia aos braços abertos do LCE numa segunda exposição ao aparelho (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007).

ETAPA B

EXPERIMENTO 3: Efeito dos agonistas 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, 5-HT_{2A/2C} DOI e 5-HT_{2C} MK-212 intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.

Em função das evidências a favor da participação da matéria cinzenta periaquedutal no estado emocional induzido pela reexposição ao LCE (BERTOGLIO et al., 2005) e dos estudos demonstrando que a facilitação da transmissão serotoninérgica nessa estrutura mesencefálica produz efeitos antiaversivos (para revisões, ver DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF et al., 1996; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; GRAEFF, 2002, 2004), a etapa B do presente estudo consistiu em investigar os efeitos de microinjeções de agonistas serotoninérgicos na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos: a descrição dos sujeitos utilizados no atual experimento é idêntica àquela já descrita no experimento 1, vide página 29.

Cirurgia e Administração Intra-MCPd de Drogas: Os animais receberam implantação de cânulas-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento, após anestesia com a combinação de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.) As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico, através das coordenadas estereotáxicas definidas pelo atlas de Paxinos e Franklin (2001). Para a MCPd, as cânulas-guia foram implantadas seguindo as seguintes coordenadas estereotáxicas: 4,1 mm posterior ao bregma, 1,4 mm lateral à linha média, 2,3 mm ventral a superfície craniana, ângulo de 26°. Uma das extremidades da cânula-guia foi posicionada 1,0 mm

dorsal à estrutura alvo. Para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação, foi inserido um estilete (mandril) nas cânulas-guia.

A injeção intracerebral das soluções foi realizada pela introdução de uma agulha de injeção (33-gauge) de 8 mm de comprimento dentro de cada cânula-guia. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubos de polietileno (PE-10) a microseringas Hamilton. As soluções foram injetadas com auxílio de uma bomba de infusão (BI 2000, INSIGHT Equipamentos), a qual foi programada para injetar as soluções numa razão de 0,1 μ l (volume de injeção) num período de 45 segundos (exceto para o experimento envolvendo 8-OH-DPAT, no qual foram injetados 0,15 μ l devido a baixa solubilidade da droga). Ao final da cirurgia os animais receberam 0,1 ml de pentabiótico pela via intramuscular (56,7 mg/kg). Analgesia pós-operatória foi provida pelo acréscimo de paracetamol (200 mg/ml) à água numa razão de 0,2 ml de paracetamol: 250 ml de água (concentração final = 0,16mg/mL) (MESSIER; ÉMOND; ETHIER, 1999).

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção dos mandril, inserção da agulha de injeção, infusão da solução, permanência da agulha de injeção por 60 segundos após o término das injeções e inserção do mandril enquanto o animal foi contido manualmente pelo experimentador com o uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução. Os animais passaram por um período de recuperação de 5-7 dias após a cirurgia antes do início dos testes comportamentais.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE): o aparato utilizado é o mesmo descrito para o Experimento 1 na página 30. Cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento para ambientação. Após

receberem a microinjeção das drogas ou veículo na matéria cinzenta periaquedutal dorsal, os camundongos foram colocados por cinco minutos numa gaiola de espera e, em seguida, foram expostos ao labirinto. Cada animal foi colocado sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e pôde explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (1 x 60 W, 55 lux no assoalho da plataforma central). O teste foi gravado através de um circuito filmadora-TV-DVD para análise posterior. Após 24 horas (reteste), os animais foram realocados em outros grupos de acordo com o tratamento recebido pré-exposição 1 (teste).

Análise comportamental: a análise comportamental foi idêntica à descrita no Experimento 1, página 31.

Histologia: após o término dos experimentos todos os animais receberam injeção de uma solução de 1% de azul de Evans na MCPd, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Em seguida, os animais foram decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para, posteriormente, sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula com o uso de um criostato (Leica CM 1850). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção.

A Figura 10 consiste numa representação esquemática dos sítios de microinjeção na MCPd. A histologia confirmou que um total de 279 camundongos receberam implantes de cânulas e microinjeções na MCP (figura 10). Os sítios de injeção atingiram

predominantemente (aproximadamente 85%) a porção dorsal (colunas dorsomedial e dorsolateral) da MCP (MCPd).

Estatística: Os resultados das sessões completas no LCE foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores (tratamento e dia do teste) seguidas por testes de comparações múltiplas de Duncan ou teste F de comparações planejadas. Adicionalmente cada sessão também foi submetida à análise de variância de um fator (tratamento). Os valores de p iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos.

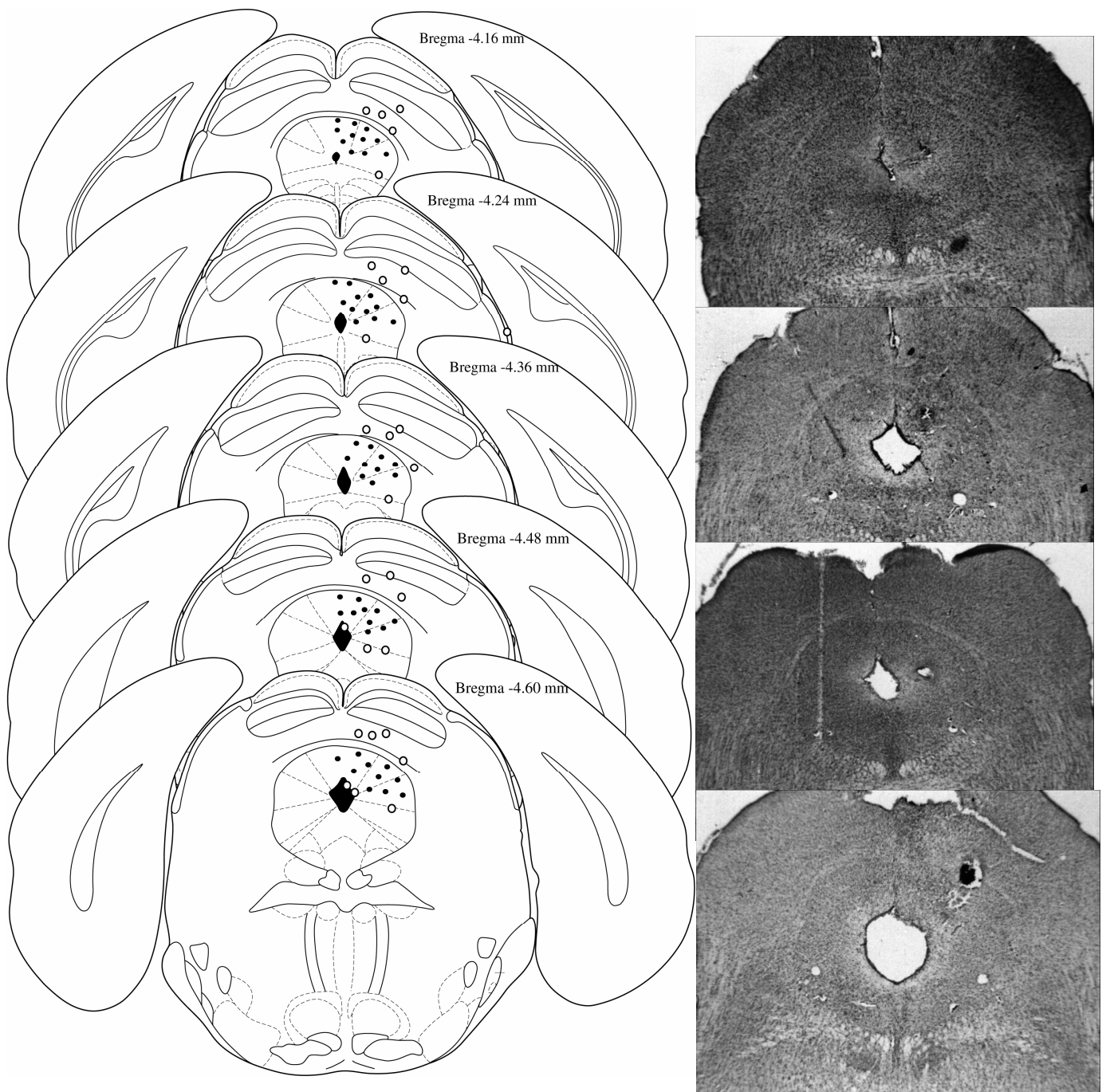


Figura 10. Representação esquemática (painel esquerdo) dos sítios de microinjeção (círculos fechados) e fotomicrografias de seções coronais (painel direito; ampliação de 32x) da material cinzenta periaquedutal (MCP) de camundongos. Os círculos abertos representam os sítios fora do alvo principal (dPAG). O número de pontos nas figuras é menor que o número total de camundongos utilizados devido a sobreposições.

3.1: Efeito do agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE

Cem camundongos, cuja análise histológica dos encéfalos foi positiva, foram utilizados para investigar os efeitos da microinjeção intra-MCPd de 8-OH-DPAT sobre o comportamento no LCE. Os grupos descritos a seguir foram distribuídos de acordo com os tratamentos intra-MCPd recebidos nos dias do teste e reteste: veículo-veículo ($n = 26$), veículo-8-OH-DPAT 5,6 nmol ($n = 13$), veículo-8-OH-DPAT 10,0 nmol ($n = 12$), 8-OH-DPAT 5,6 nmol-veículo ($n = 12$), 8-OH-DPAT 10,0 nmol-veículo ($n = 12$), 8-OH-DPAT-8-OH-DPAT 5,6 nmol ($n = 14$), 8-OH-DPAT-8-OH-DPAT 10,0 nmol ($n = 11$).

Droga: 8-OH-DPAT: (8-hidróxi-2-[di-n-propilamino] tetralina; RBI), agonista seletivo para receptores 5-HT_{1A}, injetado no volume de 0,15µL na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. O composto foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de 2% de Tween 80. As doses de 5,6 e 10 nmol foram baseadas em estudos prévios (NOGUEIRA; GRAEFF, 1995; FACHINI et al., 2004).

RESULTADOS

A Figura 11 ilustra a frequência de entradas nos braços fechados durante 5 minutos de exposição ao teste e reteste no LCE.

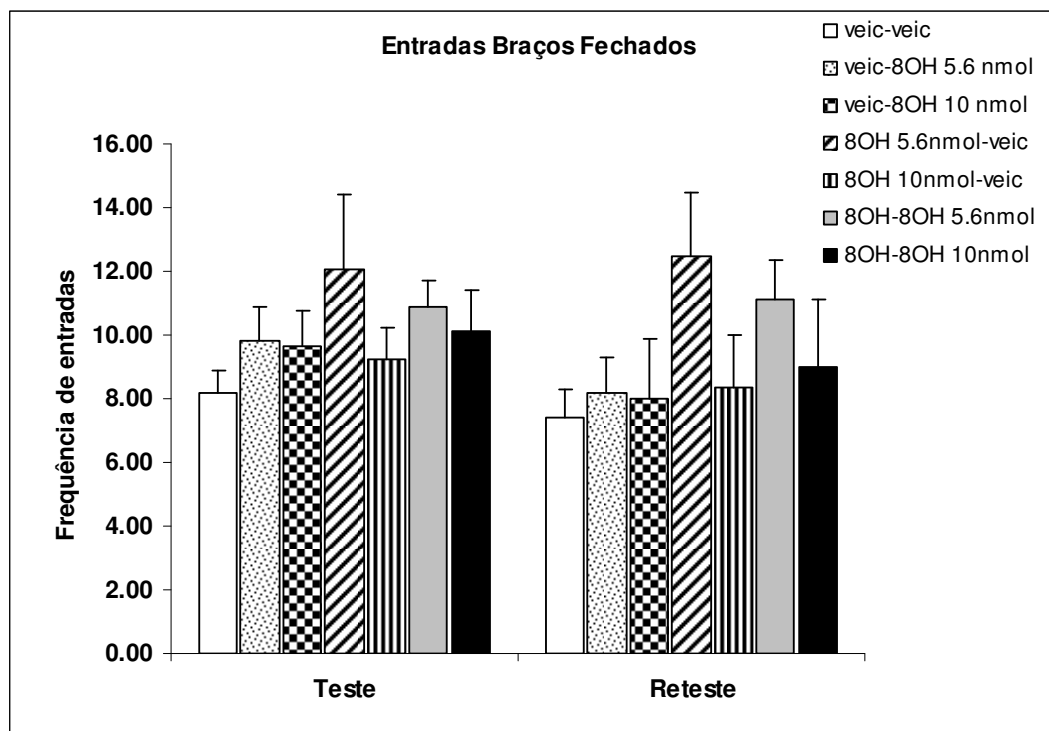


Figura 11: Frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=11-26/grupo.

A ANOVA revelou significância para o fator tratamento [$F(6,93)=2,31$, $p<0,05$), mas não para o fator dia do teste [$F(1,93)=1,53$, $p>0,05$] ou interação entre os fatores [$F(6,93)=0,24$, $p>0,05$]. A análise post hoc não confirmou diferenças na frequência de entradas entre os grupos, com exceção do grupo 8-OH-DPAT 5,6 nmol-veículo, que exibiu uma maior locomoção quando comparado aos demais ($p<0,05$), exceto 8-OH-DPAT-8-OH-DPAT 5,6 nmol e 8-OH-DPAT-8-OH-DPAT 10 nmol. A ANOVA unifatorial intra-dia não mostrou diferenças no teste [$F(6,93)=1,30$, $p>0,05$] ou no reteste [$F(6,93)=1,69$, $p>0,05$].

As Figuras 12 e 13 ilustram os índices de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

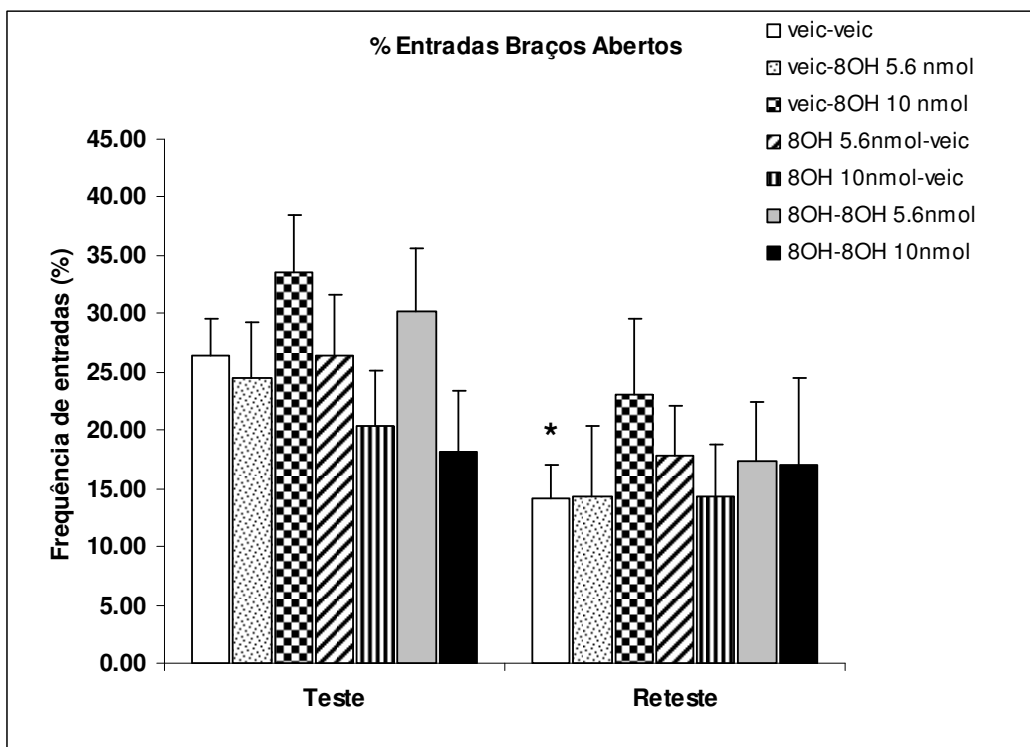


Figura 12: Porcentagem de entradas nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média ± EPM. N=11-26/grupo. *p<0,05 versus grupo correspondente no teste.

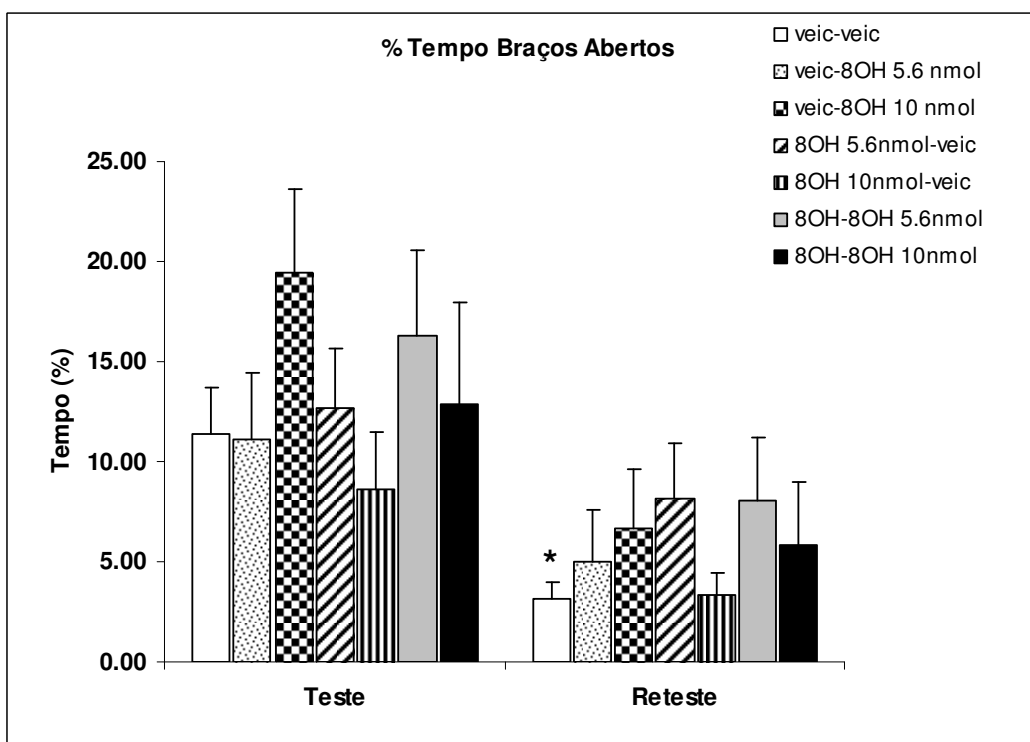


Figura 13: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média ± EPM. N=11-26/grupo. *p<0,05 versus grupo correspondente no teste.

Como sumarizado nas Figuras 12 e 13, as infusões de 8-OH-DPAT (5,6 ou 10 nmol/0,15 μ l) não afetaram as medidas convencionais de ansiedade no LCE (% entradas BA: $F(6,93)=0,74$; $p>0,05$; % tempo BA: $F(6,93)=1,21$, $p>0,05$). A ANOVA bifatorial confirmou significância para o fator dia do teste tanto para porcentagem de entradas como para porcentagem de tempo nos braços abertos [$F(1,93)=21,78$, $p<0,05$ e $F(1,93)=29,34$, $p<0,05$, respectivamente), porém não houve interação entre os fatores tratamento e dia do teste [$F(6,93)=0,66$, $p>0,05$ e $F(6,93)=0,51$, $p>0,05$, respectivamente). O teste post hoc de Duncan para o fator dia do teste mostrou uma redução da exploração dos braços abertos no reteste para ambos os índices de ansiedade ($p<0,05$); o teste F de comparações planejadas confirmou uma redução na exploração dos braços abertos no reteste para o grupo veículo-veículo [% entradas: $F(1,93)=11,80$; % tempo: $F(1,93)=10,10$, $p<0,05$]. As análises com ANOVA unifatorial também não confirmaram quaisquer diferenças para os índices de ansiedade tanto no dia do teste como no reteste [maior valor de $F(6,93)=1,11$, $p>0,05$].

3.2: Efeito do agonista 5-HT_{2A/2C} DOI intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE

Noventa e nove camundongos cuja análise histológica dos encéfalos foi positiva foram utilizados para investigar os efeitos da microinjeção intra-MCPd de DOI sobre o comportamento de camundongos no LCE. Os grupos descritos a seguir foram distribuídos de acordo com os tratamentos intra-MCPd recebidos no dia do teste e reteste: veículo- veículo ($n = 19$), veículo-DOI 2,0 nmol ($n = 13$), veículo-DOI 8,0 nmol ($n = 13$), DOI 2,0 nmol-veículo ($n = 12$), DOI 8,0 nmol-veículo ($n = 11$), DOI-DOI 2,0 nmol ($n = 19$), DOI-DOI 8,0 nmol ($n = 12$).

Droga: DOI [(2,5-dimetoxi-4-iodofenil-2-aminopropano) hidrocloreto, RBI], agonista para receptores 5-HT_{2A/2C}, mais seletivo para receptores 2A disponível comercialmente (PIERRE; PETROUTKA, 1989; TITELER; LYON; GLENNON, 1988; PORTER et al., 1999) foi injetado no volume de 0,10µL na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral. O composto foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de 2% de Tween 80. As doses de 2 e 8 nmol foram baseadas em estudos prévios (NOGUEIRA; GRAEFF, 1995) ou experimentos pilotos.

RESULTADOS

A Figura 14 ilustra a frequência de entradas nos braços fechados do durante 5 minutos de exposição ao LCE no teste e reteste.

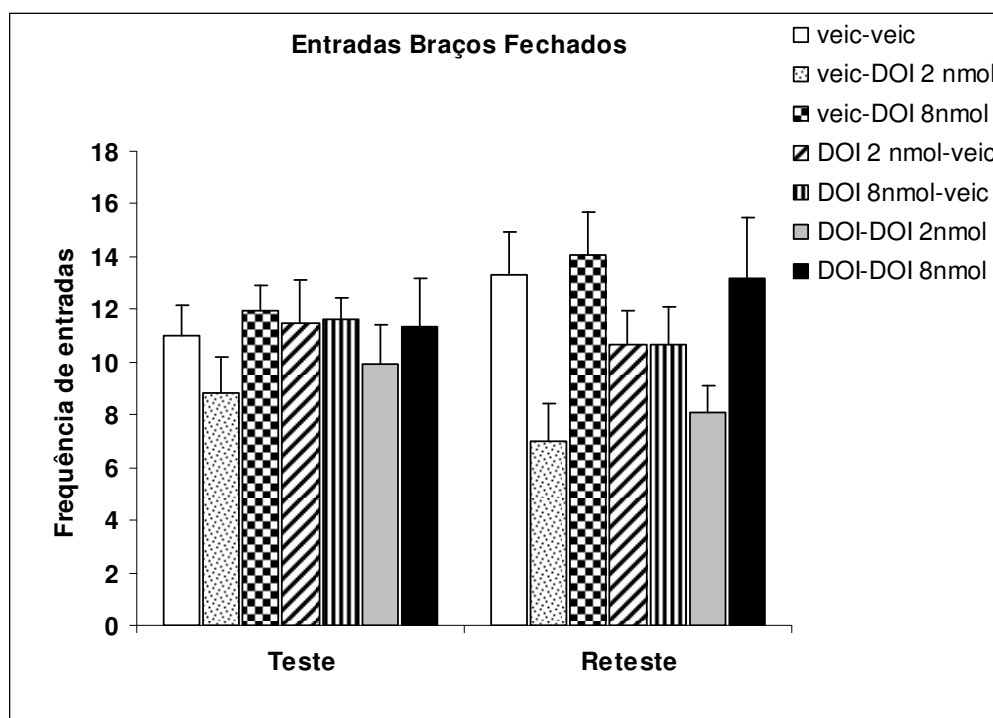


Figura 14: Frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média ± EPM. N=11-19/grupo.

ANOVA bifatorial não revelou significância para os fatores analisados para entradas nos braços fechados [fator tratamento: $F(6,92)=2,10$, $p>0,05$; fator dia do teste: $F(1,92)=0,01$, $p>0,05$ interação tratamento x dia do teste: $F(6,92)=1,45$ $p>0,05$).

As Figuras 15 e 16 ilustram os índices de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

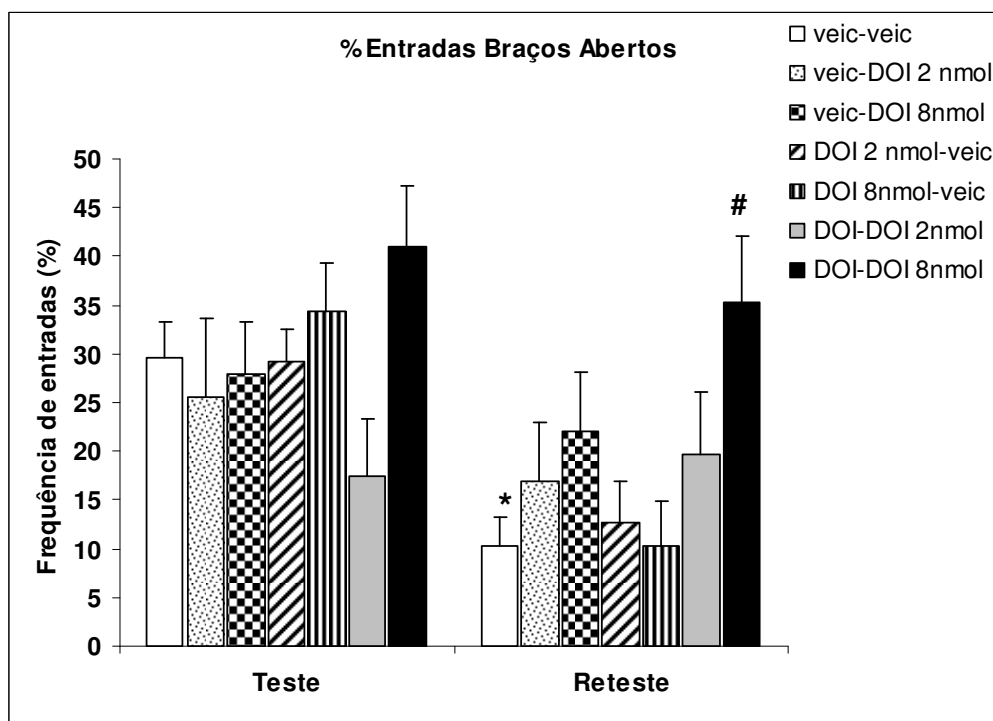


Figura 15: Porcentagem de entradas nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. $N=11-19$ /grupo. * $p<0,05$ versus grupo correspondente no teste; # $p<0,05$ versus demais grupos no reteste, exceto veic-DOI 8 nmol.

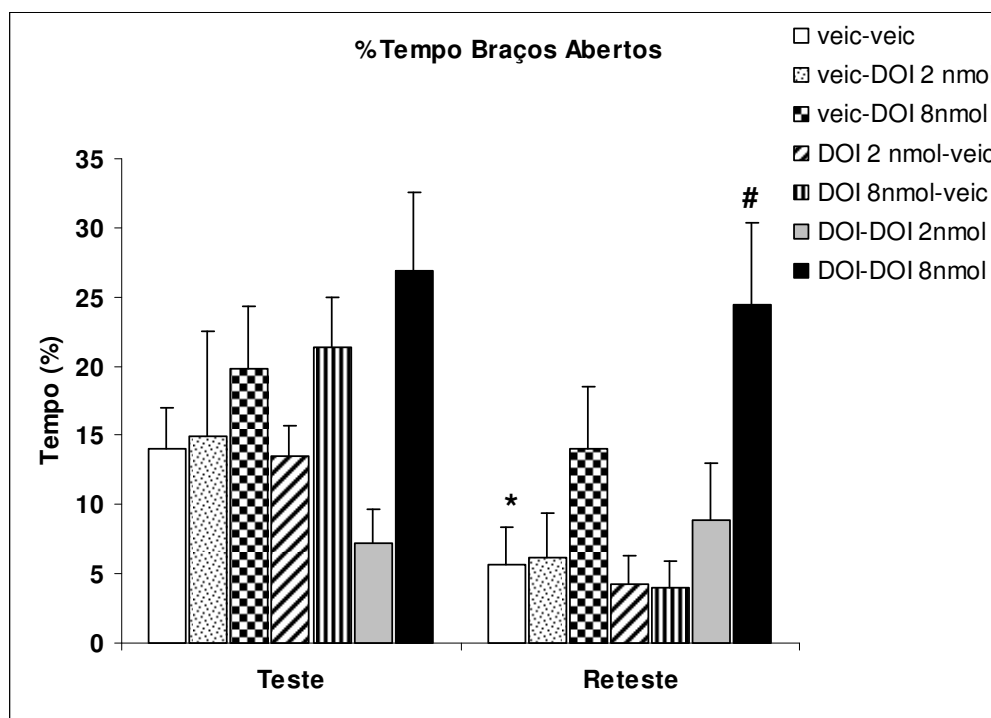


Figura 16: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=11-19/grupo. * $p < 0,05$ versus grupo correspondente no teste; # $p < 0,05$ versus demais grupos no reteste, exceto veic-DOI 8 nmol.

A análise de variância mostrou significância para o fator dia do teste e interação entre tratamento e dia do teste para ambos os índices de ansiedade [**Porcentagem de entradas no BA** - Fator tratamento: $F(6,92)=1,63$, $p > 0,05$; Fator dia do teste: $F(1,92)=29,45$, $p < 0,05$; Interação tratamento x dia do teste: $F(6,92)=3,32$, $p < 0,05$; **Porcentagem de tempo no BA** - Fator tratamento: $F(6,92)=2,69$, $p < 0,05$; Fator dia do teste: $F(1,92)=49,63$, $p < 0,05$; Interação tratamento x dia do teste: $F(6,92)=4,25$, $p < 0,05$]. O teste post hoc de Duncan revelou, de maneira geral, uma diminuição na exploração dos braços abertos no segundo dia de exposição ($p < 0,05$), o que foi confirmado pelo teste F para o grupo veiculo-veiculo [% entradas: $F(1,92)=26,46$; % tempo: $F(1,92)=26,34$, $p < 0,05$]. No entanto, aumentos nas porcentagens de entradas e tempo nos braços abertos foram observados para o grupo DOI-DOI 8 nmol em comparação aos demais ($p < 0,05$),

com exceção do grupo veiculo-DOI 8nmol. A análise de variância unifatorial aplicada as porcentagens de entradas não revelou nenhuma diferença entre os grupos no teste [F (6,92)=1,55, $p>0,05$], enquanto foi observada significância na comparação entre os grupos no reteste [F (6,92)=2,48, $p<0,05$]. Corroborando os dados da análise de variância bifatorial, o teste de Duncan no reteste confirmou novamente um aumento na exploração dos braços abertos para o grupo DOI-DOI 8nmol em comparação aos demais ($p<0,05$), com exceção do grupo veiculo-DOI 8nmol. A ANOVA unifatorial para porcentagem de tempo nos braços abertos mostrou diferenças entre os grupos tanto no teste como no reteste [F(6,92)=3,34, $p>0,05$ e F(6,92)=2,85, $p<0,05$, respectivamente]. As possíveis comparações post hoc revelaram uma redução na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos para o grupo DOI-DOI 2nmol em relação aos demais no teste ($p<0,05$), enquanto novamente um aumento foi observado para o grupo DOI-DOI 8nmol no reteste quando comparado aos demais grupos ($p<0,05$), com exceção do grupo veiculo-DOI 8nmol ($p>0,05$).

3.3: Efeito da administração sistêmica do antagonista 5-HT_{2A} eplivanserina previamente à injeção do agonista 5-HT_{2A/2C} DOI intra-MCPd na reexposição de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado.

Com a finalidade de investigar o subtipo de receptor envolvido no efeito antiaversivo do agonista 5-HT_{2A/2C} DOI na MCPd no reteste demonstrado no Experimento 3.2, um novo experimento envolvendo a injeção prévia de um antagonista 5-HT_{2A} ou veículo (no reteste) foi realizado. Para tanto, sessenta e sete camundongos cuja análise histológica dos encéfalos foi positiva foram utilizados para investigar os efeitos da administração sistêmica de eplivanserina previamente à microinjeção intra-

MCPd de DOI sobre o comportamento de camundongos no LCE. Os grupos descritos a seguir foram distribuídos de acordo com os tratamentos intraperitoneal no reteste e intra-MCPd recebidos no dia do teste e reteste: **Veículo i.p.** - veículo-veículo ($n = 8$), veículo-DOI 8,0 nmol ($n = 10$), DOI 8.0 nmol-veículo ($n = 4$), DOI-DOI 8,0 nmol ($n = 7$); **Eplivanserina 0,1 mg/Kg i.p.** - veículo-veículo ($n = 8$), veículo-DOI 8,0 nmol ($n = 8$), DOI 8,0 nmol-veículo ($n = 12$), DOI-DOI 8,0 nmol ($n = 10$). A dose utilizada (0,1mg/Kg) foi investigada quanto aos possíveis efeitos sobre a locomoção e ansiedade no labirinto em cruz elevado e quanto a motricidade em uma caixa de atividades.

Droga: Eplivanserina [(Z,E)-1-(2-Fluorofenil)-3-(4-hidroxifenil)-2-propeno-1-ona O-[2-(dimetilamino)etil]oxime, Sanofi-Synthelabo] (previamente conhecida como SR46349B), antagonista para receptores 5-HT_{2A}, (CHAOULOFF; BAUDRIE; COUPRY, 1994; RINALDI-CARMONA et al., 1992, 1993, 1994; ASHWORTH et al., 1996) foi administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes da microinjeção intra-MCPd de DOI. O composto foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de 10% de DMSO. A dose de 0,1mg/Kg foi baseada em estudos prévios (MORA; NETTO; GRAEFF, 1997; SETEM et al., 1999; BEIG et al., 2009) e experimentos pilotos (abaixo).

Curva dose-resposta da eplivanserina no labirinto em cruz elevado e na caixa de atividade locomotora

O presente experimento consistiu na injeção intraperitoneal de eplivanserina (0,1, 1,0, 3,0 ou 5,6 mg/Kg) ou veículo e após 30 minutos numa exposição única ao LCE por 5 minutos. Nesse experimento foram utilizados 43 camundongos e os

procedimentos e aparatos utilizados foram idênticos aos itens “sujeitos”, “labirinto em cruz elevado” e “análise comportamental” descritos no Experimento 1 (páginas 29 a 31).

O ensaio para avaliação da atividade locomotora consistiu em tratar os animais com eplivanserina i.p. (0,1, 1,0, 3,0 ou 5,6 mg/Kg ou veículo) e após 30 minutos expô-los durante 10 minutos a uma caixa de atividade (Columbus Instruments, CA, EUA) construída em acrílico transparente com as seguintes dimensões : 44 (comprimento) x 44 (largura) x 20 (altura) cm (Figura 17). Os animais (39 no total) foram colocados individualmente na caixa de atividade e a locomoção foi registrada automaticamente por meio de fotocélulas localizadas nas paredes das caixas a 2,5cm de intervalo umas das outras e 1,5 cm distantes do seu assoalho. Cada unidade de locomoção corresponde à interrupção consecutiva de dois feixes de raios infravermelhos emitidos pelas fotocélulas.

A análise estatística dos resultados no LCE e caixa de atividade foi realizada através da aplicação da ANOVA unifatorial (fator tratamento) seguida por testes de comparações múltiplas de Duncan.



Figura 17. Caixa de atividade locomotora (Columbus Instruments, USA)

RESULTADOS

As Figuras abaixo ilustram os resultados obtidos nos experimentos pilotos no LCE e caixa de locomoção após a administração de eplivanserina.

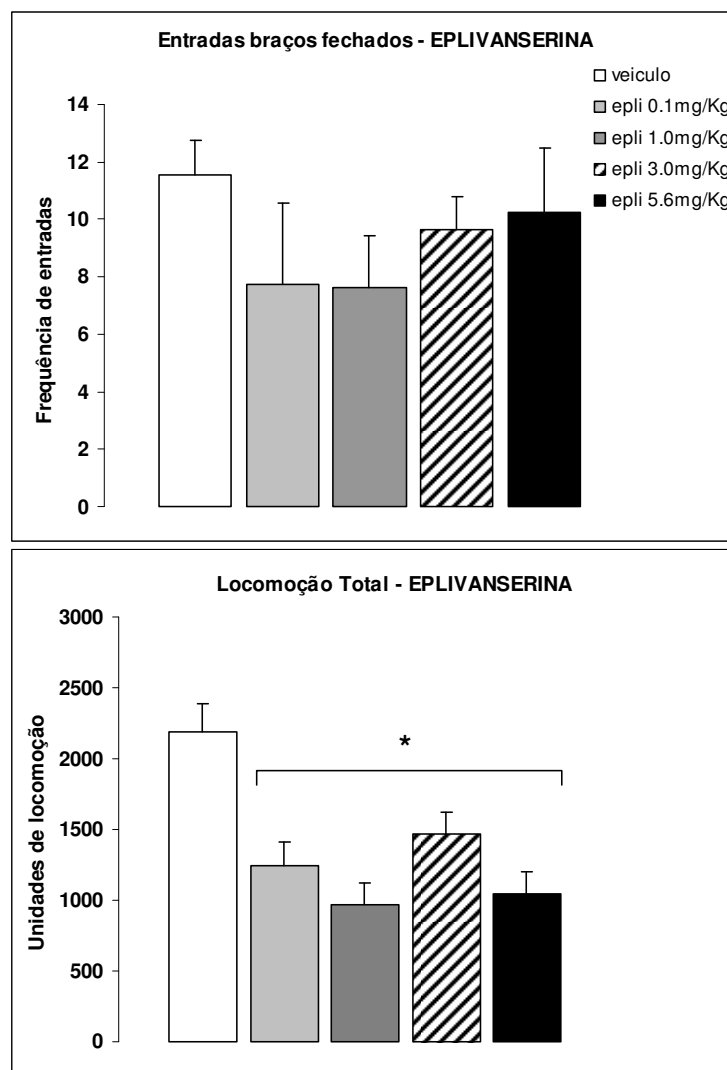


Figura 18: Frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE (painel superior, n=8-11) e unidades de locomoção na caixa de atividade (painel inferior, n=5-10) de camundongos tratados com eplivanserina (doses 0,1, 1,0, 3,0, 5,6 mg/Kg i.p.). Linhas: média \pm EPM. *p<0,05 versus veículo.

A ANOVA não revelou significância para entradas nos braços fechados do LCE [F(4,38)=0,86, p>0,05], mas um efeito significativo do fator tratamento foi mostrado

para a locomoção na caixa de atividade [$F(4,34)=9,06$, $p<0,05$], com a análise post hoc confirmando uma menor locomoção dos grupos que receberam eplivanserina em todas as doses em comparação ao veículo ($p<0,05$).

A Figura seguinte representa os índices de ansiedade registrados no LCE após a administração de várias doses de eplivanserina.

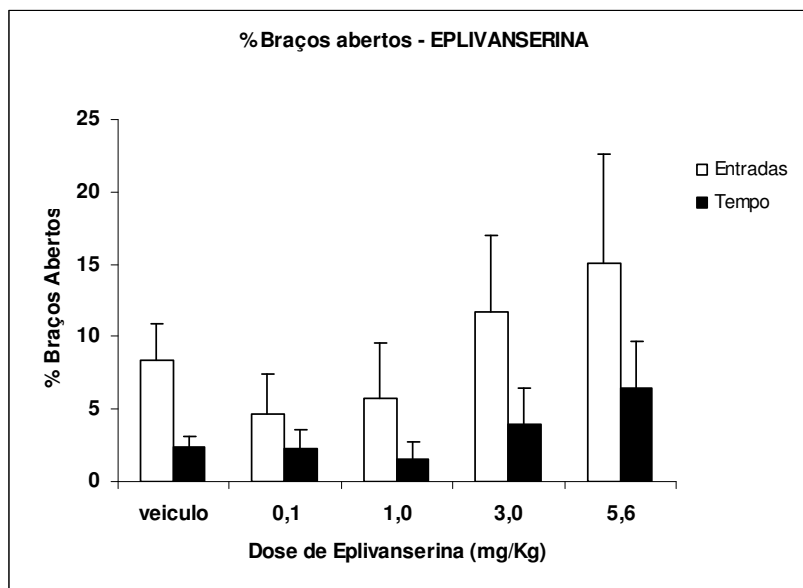


Figura 19: Porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos (BA) do LCE de camundongos tratados com Eplivanserina (doses 0,1, 1,0, 3,0, 5,6 mg/Kg i.p.) N=8-11. Linhas: média \pm EPM

A análise de variância não evidenciou significância para o fator tratamento nas porcentagens de entradas [$F(4,38)=0,84$, $p>0,05$] ou porcentagens de tempo [$F(4,38)=1,01$, $p>0,05$] nos braços abertos do LCE.

Em suma, os resultados do experimento piloto indicam que a eplivanserina tem a propriedade de interferir na locomoção de animais testados numa caixa de atividade. Embora o mesmo não fora evidenciado no LCE, a menor dose (0,1mg/Kg) foi a escolhida para ser utilizada nas etapas posteriores que incluíram a injeção combinada do antagonista 5-HT_{2A} i.p. e a microinjeção de DOI intra-MCPd. É importante ressaltar que a dose de 0,1 mg/Kg é desprovida de efeitos intrínsecos sobre os índices de ansiedade.

Dessa forma, a Figura 20 ilustra a frequência de entradas nos braços fechados durante 5 minutos de exposição ao LCE no teste e reteste.

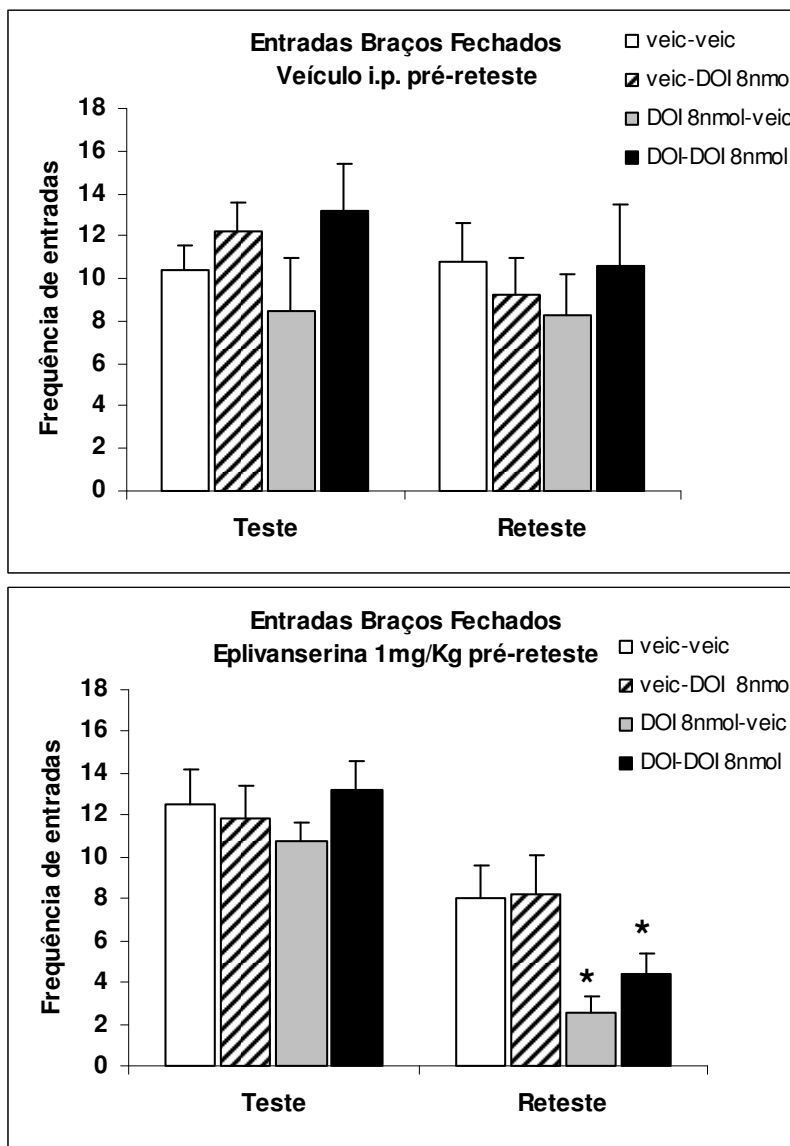


Figura 20: Frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=4-12/grupo. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos veic-veic e veic-DOI 8nmol no reteste.

A ANOVA bifatorial não revelou quaisquer diferenças entre os fatores para o experimento que envolveu a injeção do veículo i.p. 30 minutos antes da microinjeção de

DOI intra-MCPd no reteste [Fator tratamento: $F(3,25)=0,45$, $p>0,05$; Fator dia do teste: $F(1,25)= 2,24$, $p>0,05$; Interação tratamento x dia do teste: $F(3,25)=1,00$, $p>0,05$]. Da mesma forma, a ANOVA de um fator também não evidenciou diferenças intra-dia [Teste: $F(3,25)=1,11$; Reteste: $F(3,25)=0,23$, $p>0,05$]. Já no experimento com a eplivanserina, a ANOVA bifatorial revelou efeitos do tratamento intra-MCPd [$F(3,34)=3,60$, $p<0,05$] e do dia do teste [$F(1,34)=48,1$, $p<0,05$], mas não da interação entre os fatores [$F(3,34)=2,02$, $p>0,05$]. A análise post hoc confirmou uma diminuição no total de entradas nos braços fechados no reteste ($p<0,05$). De fato, a ANOVA de um fator mostrou significância apenas para o dia do reteste [Teste - $F(3,34)=0,71$, $p>0,05$; Reteste - $F(3,34)=5,24$, $p<0,05$], com a análise post hoc confirmando uma menor frequência de entradas para os grupos DOI 8nmol-veic e DOI-DOI 8nmol versus veiculo-veiculo e veiculo-DOI 8nmol ($p<0,05$).

As Figuras a seguir representam os índices de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

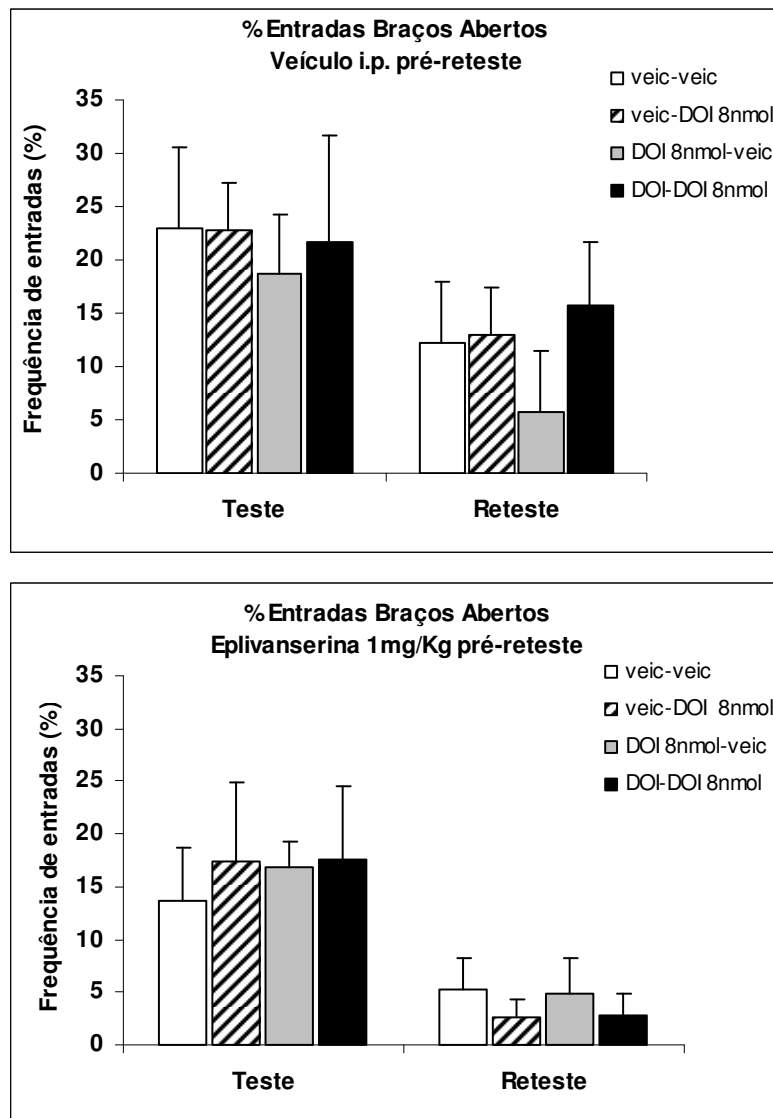


Figura 21: Porcentagem de entradas nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=4-12/grupo.

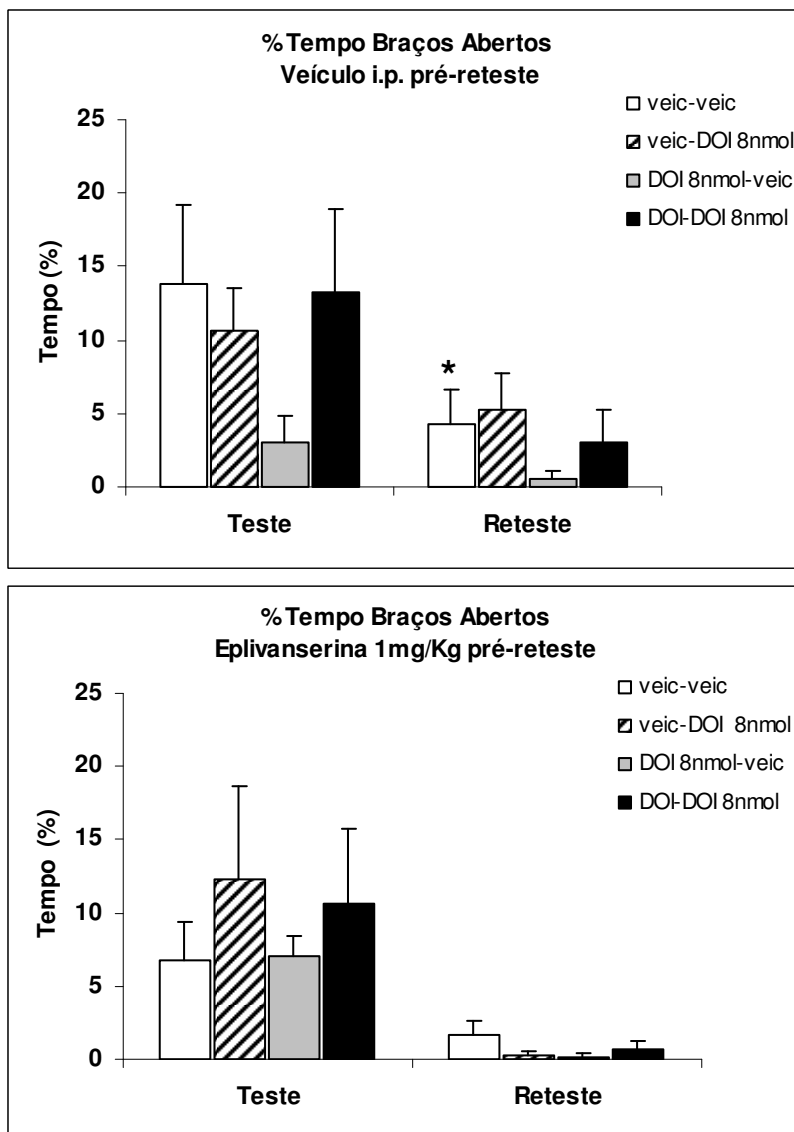


Figura 22: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=4-12/grupo. * $p < 0,05$ versus grupo correspondente no teste

As análises com ANOVA bifatorial evidenciaram, para ambos os índices de ansiedade em ambos os experimentos envolvendo tratamentos i.p. pré-reteste, efeitos significativos do fator dia do teste (menor valor de $F=5,92$, $p < 0,05$), enquanto nenhuma significância foi mostrada para os demais fatores (maior valor de $F= 0,78$, $p > 0,05$). As análises post hoc de Duncan confirmaram reduções na exploração dos braços abertos no

reteste ($p < 0,05$), o que foi também revelado pelo teste F para porcentagem de tempo nos braços abertos para o grupo veículo-veículo somente no experimento envolvendo a administração de veículo i.p. [$F(1,25)=6,15$, $p < 0,05$; demais comparações: maior valor de $F=2,20$, $p > 0,05$]. A ANOVA de um fator para ambos os índices de ansiedade nos dois experimentos não revelou nenhum efeito significativo do fator tratamento intra-MCPd (maior valor de $F=1,37$, $p > 0,05$).

3.4: Efeito do agonista 5-HT_{2C} MK-212 intra-MCPd em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE

Oitenta camundongos cuja análise histológica dos encéfalos foi positiva foram utilizados para investigar os efeitos da microinjeção intra-MCPd de Mk-212 sobre o comportamento de camundongos no LCE. Os grupos descritos a seguir foram distribuídos de acordo com os tratamentos intra-MCPd recebidos no dia do teste e reteste: veículo- veículo ($n = 15$), veículo-MK-212 21,2 nmol ($n = 12$), veículo -MK-212 63,6 nmol ($n = 8$), MK-212 21,2 nmol- veículo ($n = 14$), MK-212 63,6 nmol-veículo ($n= 9$), MK-212-MK-212 21,2 nmol ($n= 9$), MK-212-MK-212 63,6 nmol ($n= 13$)].

Droga: MK-212 [6-cloro-2(1-piperazinil)piperazina hidrocloreto; RBI], agonista seletivo para receptores do tipo 5-HT_{2C} foi injetado em um volume de 0,10 µl na MCPd. O composto foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de 2% de Tween 80. As doses de 21,2 e 63,6 nmol foram baseadas em estudos prévios (ALVES et al., 2004) ou experimentos pilotos.

RESULTADOS

A Figura 23 ilustra a frequência de entradas nos braços fechados do durante 5 minutos de exposição ao LCE no teste e reteste.

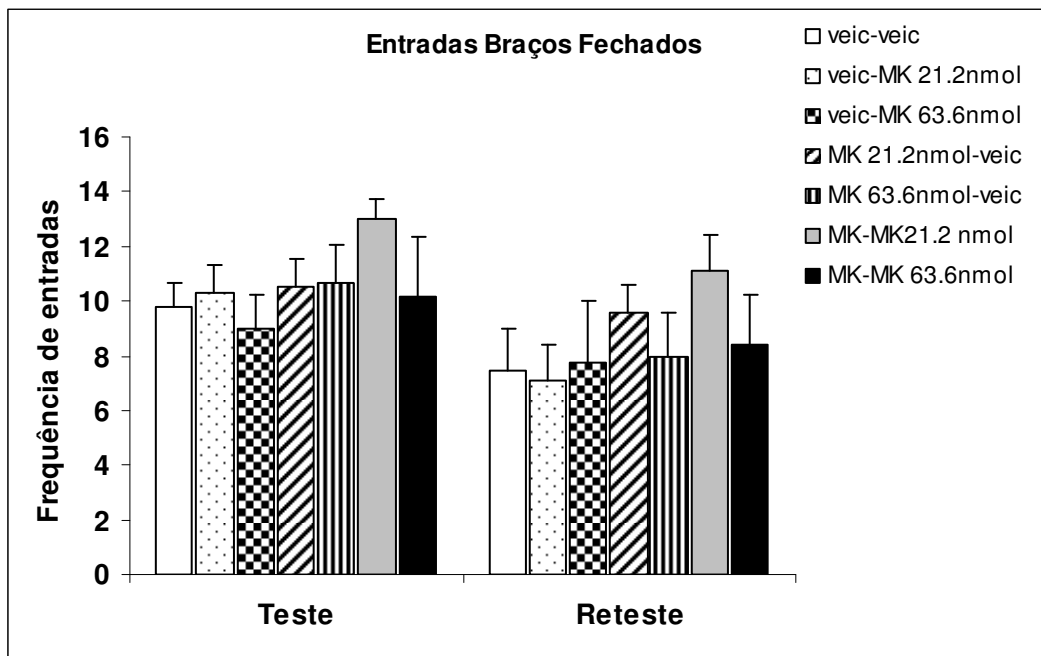


Figura 23: Frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média \pm EPM. N=8-15/grupo.

ANOVA bifatorial para entradas nos braços fechados revelou significância para o fator dia do teste [$F(1,73)=8,99$, $p<0,05$], mas não para o fator tratamento ou interação tratamento x dia do teste [$F(6,73)=0,98$; $F(6,73)=0,22$; $p>0,05$, respectivamente]. O teste de Duncan revelou uma redução na frequência de entradas nos braços fechados no reteste ($p<0,05$). No entanto, a análise intra-dia através da ANOVA unifatorial não mostrou significância no dia do teste [$F(6,73)=1,93$, $p>0,05$] ou no reteste [$F(6,73)=0,93$, $p>0,05$].

As Figuras 24 e 25 ilustram os índices de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

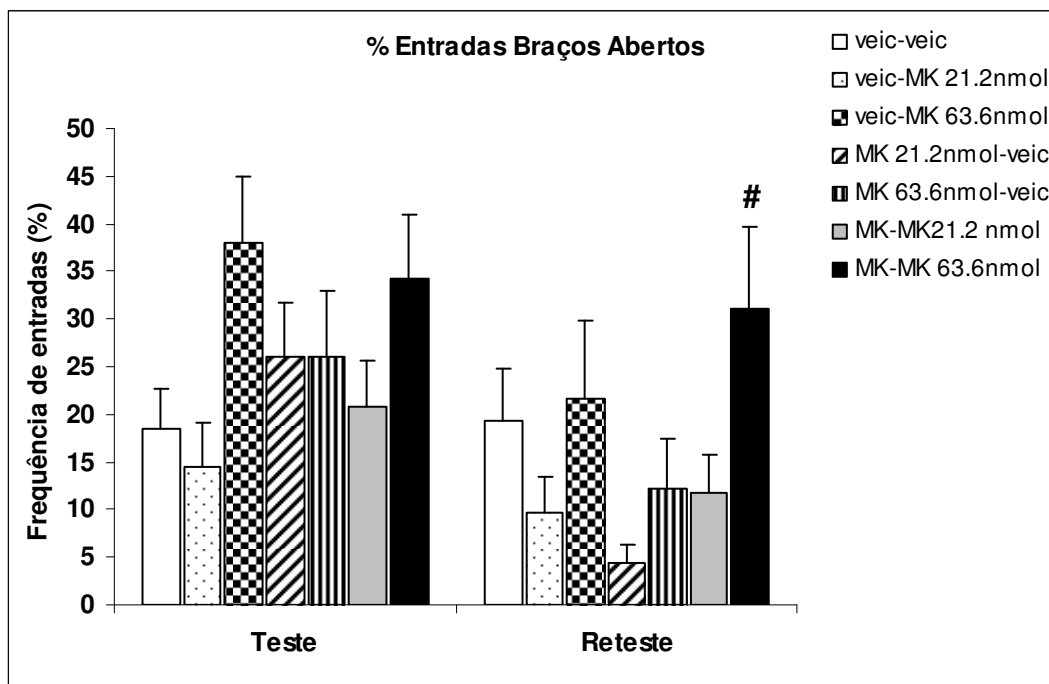


Figura 24: Porcentagem de entradas nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média ± EPM. N=8-15/grupo. #p<0,05 versus demais grupos no reteste, exceto veic-veic e veic-MK 63.6nmol.

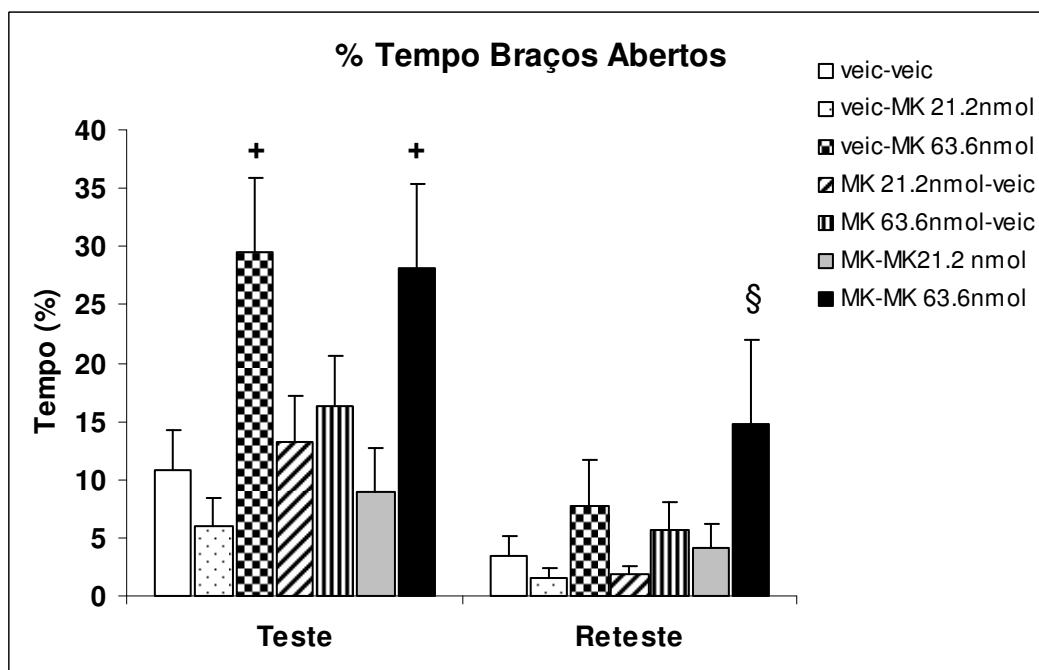


Figura 25: Porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) do LCE no teste ou reteste. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente às exposições ao LCE no primeiro ou segundo dia, respectivamente. Linhas: média ± EPM. N=8-15/grupo.; + p<0,05 versus demais grupos no teste; § p<0,05 versus veic-veic no reteste.

A ANOVA bifatorial aplicada aos índices de ansiedade mostrou que enquanto houve significância para os fatores dia do teste e tratamento para ambos os comportamentos, a interação entre os fatores foi significativa apenas para porcentagem de entradas nos braços abertos [**Porcentagem de entradas no BA** - Fator tratamento: $F(6,73)=2,41$, $p<0,05$; Fator dia do teste: $F(1,73)=19,54$, $p<0,05$; Interação tratamento x dia do teste: $F(6,73)=2,25$, $p<0,05$; **Porcentagem de tempo no BA** - Fator tratamento: $F(6,73)=3,95$, $p<0,05$; Fator dia do teste: $F(1,73)=30,4$, $p<0,05$; Interação tratamento x dia do teste: $F(6,73)=1,18$, $p>0,05$]. A análise post hoc confirmou uma redução da exploração dos braços abertos no reteste ($p<0,05$). A mesma análise mostrou ainda que quase invariavelmente o grupo MK-MK 63,6nmol apresentou maiores índices de exploração dos braços abertos em comparação aos demais grupos, com a exceção do grupo veic-MK 63,6nmol. O teste F de comparações planejadas revelou um valor de P próximo da significância para porcentagem de tempo nos braços abertos do grupo veiculo-veiculo na comparação teste versus reteste [$F(1,73)=3,02$, $p=0,08$; %entradas: $F(1,73)=0,02$, $p>0,05$]. A ANOVA unifatorial para porcentagem de entradas nos braços abertos não revelou diferenças entre os grupos no teste [$F(6,73)=1,45$, $p>0,05$], enquanto para o reteste foi revelada significância [$F(6,73)=2,69$, $p<0,05$]. A análise post hoc confirmou um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos para o grupo MK-MK63,6nmol em comparação aos demais ($p<0,05$), com exceção dos grupos veiculo-veiculo e veiculo-MK 63,6nmol ($p>0,05$). Quanto as porcentagens de tempo nos braços abertos, a ANOVA unifatorial mostrou diferenças entre os grupos no teste [$F(6,73)=3,57$, $p<0,05$] e um valor de P próximo da significância no reteste [$F(6,73)=1,92$, $p=0,08$]. O teste de Duncan confirmou uma maior porcentagem de tempo nos braços abertos para o grupo veiculo-MK 63,6nmol comparado aos demais grupos ($p<0,05$), exceto MK 63,6nmol-veiculo e MK-MK 63,6nmol ($p>0,05$). Além

disso, o grupo MK-MK 63,6nmol também apresentou maior exploração dos braços abertos em relação aos demais grupos no teste ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Em suma, os resultados demonstram que microinfusões de DOI (um agonista 5-HT_{2A/2C}) e MK-212 (um agonista preferencial 5-HT_{2C}), mas não 8-OH-DPAT (um agonista seletivo 5-HT_{1A}) na porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal atenuam a ansiedade no LCE em camundongos com experiência prévia no aparelho. Cabe ressaltar que esse efeito foi predominantemente observado em animais que também receberam microinfusões intra-MCPd de DOI ou MK-212 antes da primeira exposição. O tratamento prévio com o antagonista 5-HT_{2A} eplivanserina bloqueou os efeitos antiaversivos do agonista DOI na segunda exposição, embora essa interpretação tenha sido prejudicada pela não reprodução desse efeito no experimento no qual o veículo foi utilizado.

As reduções dos valores médios dos índices de ansiedade nas sessões completas (5 minutos) no LCE para animais expostos previamente ao aparelho corroboram estudos prévios mostrando que roedores exploram menos os braços abertos do LCE na segunda exposição (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000, 2003; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; HOLMES; RODGERS, 1998; RODGERS et al., 1996; FILE et al., 1993; FILE; ZANGROSSI, 1993). É importante ressaltar que essas diminuições da exploração do aparelho ocorreram de forma seletiva para os braços abertos, uma vez que não houve diferenças entre a primeira e a segunda exposição para as entradas nos braços fechados. Ainda, cabe destacar que na maioria dos casos as reduções na exploração dos braços

abertos foram confirmadas para os grupos que receberam veículo intra-MCPd antes do teste e reteste.

A ausência de efeito do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT não corrobora estudos anteriores, que demonstraram efeitos antiaversivos no LCE e em outros modelos de ansiedade com a administração desse fármaco (para uma revisão ver MENARD; TREIT, 1999; GRAEFF, 2004). No entanto, é necessário levar-se em consideração que os efeitos antiaversivos reportados para o 8-OH-DPAT variam de acordo com inúmeros fatores, tais como o modelo animal utilizado, sítio de injeção, dose e espécie animal utilizada e experiência prévia (para revisões, ver GRAEFF, 2004; MENARD; TREIT, 1999; ENGIN; TREIT, 2008). Nesse sentido, um estudo recente realizado em ratos por Broiz (2008) demonstrou um efeito ansiolítico do agonista 8-OH-DPAT microinjetado na MCPd de ratos que receberam estimulação elétrica na mesma estrutura. Porém o fármaco perdeu suas propriedades antiaversivas quando os animais possuíam experiência aversiva prévia (medo condicionado contextual). Esse fato, somado aos efeitos contraditórios obtidos com a investigação da participação dos receptores 5-HT_{1A} em diferentes estruturas no modelo do LCE (BELCHEVA et al., 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1994; GONZALEZ; ANDREWS; FILE, 1996; MENARD; TREIT, 1998) corroboram parcialmente a ausência de efeitos obtida no presente estudo. Embora esses resultados não excluam a participação desses receptores na neurobiologia da ansiedade induzida pela exposição ao LCE, são sugestivos de que esses receptores na MCPd não exercem influências sobre o estado emocional induzido pela exposição e reexposição ao LCE em camundongos.

Os efeitos antiaversivos produzidos pelo agonista preferencial 5-HT_{2A} DOI vão ao encontro de vários resultados na literatura com variados modelos de ansiedade (para revisões, ver GRAEFF, 2004; MENARD; TREIT, 1999). As propriedades desse

fármaco sobre o comportamento de ratos expostos ao LCE e outros modelos de ansiedade que envolvem teste e reteste foram extensivamente investigadas pelo grupo liderado pelo pesquisador Michel Bourin (DHONNCHADHA; BOURIN; HASCÖET, 2003; DHONNCHADHA et al., 2003; RIPOLL; HASCÖET; BOURIN, 2006; MASSÉ; HASCÖET; BOURIN, 2007). Em suma, foi encontrado que a injeção sistêmica de DOI produz efeito ansiolítico em camundongos expostos ao teste das 4 plataformas e ao LCE (DHONNCHADHA; BOURIN; HASCÖET, 2003). Em outro estudo, esses resultados foram reproduzidos e adicionalmente foi encontrado que esses efeitos foram abolidos pelo pré-tratamento com antagonistas seletivos para o receptor 5-HT_{2A}, mas não para antagonistas 5-HT_{2B} ou 5-HT_{2C} (DHONNCHADHA et al., 2003). Esses dados são importantes, visto que o fármaco DOI, apesar de ser considerado um dos agonistas 5-HT_{2A} mais seletivos dentre os disponíveis (PIERRE; PETROUTKA, 1989; TITELER; LYON; GLENNON, 1988; PORTER et al., 1999), também possui afinidade por outros receptores 5-HT₂ (BAXTER et al., 1995). A continuidade na investigação dos efeitos do DOI em modelos animais de ansiedade levou o grupo de Michel Bourin a testar a droga em animais expostos previamente ao teste das 4 plataformas. Semelhante aos achados no presente estudo, o tratamento com DOI impediu o aumento da ansiedade na 2ª exposição ao teste das 4 plataformas. Ainda, esse efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com antagonistas específicos para receptores 5-HT_{2A} (RIPOLL; HASCÖET; BOURIN, 2006). Levando-se em consideração que o fenômeno da OTT não é exclusivo para o modelo do LCE, mas também ocorre em outros modelos como teste claro/escuro (HOLMES, et al., 2001), teste do odor ao predador (McGREGOR; DIELENBERG, 1999) e teste das 4 plataformas (RIPOLL et al., 2005; RIPOLL; HASCÖET; BOURIN, 2006; HASCÖET; BOURIN; COUETOUX DU TERTRE, 1997), nossos resultados corroboram e dão robustez a esses achados.

O mecanismo pelo qual o agonista DOI exerce seus efeitos antiaversivos é desconhecido. No entanto, achados da literatura dão suporte a hipótese de que os efeitos ansiolíticos de agonistas 5-HT_{2A} podem ser mediados por uma facilitação da transmissão serotoninérgica (para uma revisão ver DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2004) ou GABAérgica (MASSÉ; HASCÖET; BOURIN, 2007; MASSÉ et al., 2007) na MCP. A última tem suporte em estudos que demonstram a colocalização de receptores GABAérgicos e 5-HT_{2A} na matéria cinzenta periaquedutal (GRIFFITHS; LOVICK, 2002) e na facilitação da neurotransmissão GABAérgica provocada pela ativação de receptores 5-HT_{2A} pré-sinápticos (para uma revisão, ver MILLAN, 2003; CASTILHO; MACEDO; BRANDÃO, 2002; COZZI; NICHOLS, 1996). Além disso, Massé, Hascöet e Bourin (2007) reportaram que subdoses de alprazolam e diazepam foram potencializadas pela co-administração de DOI e provocaram efeitos ansiolíticos no LCE e teste das 4 plataformas. Num outro estudo conduzido pelo grupo, a co-administração de muscimol (agonista dos receptores GABA-A) e bicuculina ou picrotoxina (antagonistas GABA-A) potencializou e impediu, respectivamente, os efeitos ansiolíticos de subdoses de DOI. De modo interessante, a coadministração com flumazenil não alterou o perfil comportamental provocado pelo agonista 5-HT_{2A}, sugerindo que a interação entre o sistema gabaérgico e DOI não ocorre especificamente no sítio benzodiazepínico (MASSÉ et al., 2007). Muito embora também seja possível que o efeito ansiolítico do DOI decorra de sua ação direta em neurônios serotoninérgicos, a hipótese de uma facilitação da neurotransmissão gabaérgica ganha reforço com base nos resultados obtidos por Massé et al (2006), no qual a depleção de serotonina pela administração de pCPA não reduz o efeito ansiolítico do agonista 5HT_{2A} no teste das quatro plataformas.

Considerando-se que ocorrem alterações no *status* funcional de receptores 5-HT_{2A} e diminuição na expressão de RNA mensageiro e proteínas receptoras 5-HT_{2A} no encéfalo de ratos expostos a estresse agudo (CHAOULOFF; BAUDRIE; COUPRY, 1994; IZUMI et al., 2002; VAIDYA et al., 1999; WU et al., 1999) pode ser levantada a hipótese de que a experiência no LCE leva a uma diminuição da atividade espontânea desses receptores e uma conseqüente diminuição da transmissão GABAérgica, resultando num aumento da ansiedade que é revertido pela administração de DOI. Essa hipótese é corroborada pelos resultados obtidos no presente estudo com o DOI, uma vez que esse agonista 5-HT_{2A} não produziu efeito ansiolítico numa primeira exposição ao LCE. Ainda, os resultados desse e de outros trabalhos que mostram que um exposição de 5 minutos ao LCE resulta em um marcante aumento nos níveis de corticosterona plasmática também dão suporte a essa hipótese (FILE et al., 1994, RODGERS et al., 1999, ALBRECHET-SOUZA et al., 2007).

É importante ressaltar que o efeito antiaversivo do DOI foi observado com a maior dose testada (8 nmol) em animais em animais que receberam o mesmo tratamento intra-MCPd na primeira exposição (grupo DOI-DOI). É possível que a administração prévia de DOI influenciou a associação entre o aparato do LCE e o estado emocional vivenciado de tal forma que o fármaco pode ter reduzido a aversividade da primeira exposição, atenuando o estado de ansiedade no contexto do LCE. Nesse contexto, os resultados obtidos por File et al (1990) e McGregor e Dielenberg (2001) citados anteriormente parecem dar suporte a essa hipótese.

De forma intrigante, a menor dose (2 nmol) produziu um efeito ansiogênico na primeira exposição ao LCE. Embora estatisticamente significante, esse efeito inesperado não parece ser consistente, uma vez que ambos os grupos DOI-DOI e DOI-veículo receberam o mesmo tratamento e dose do agonista de receptores 5-HT_{2A} na

primeira exposição. Dessa forma, embora sejam essencialmente o mesmo grupo na primeira exposição, o efeito ansiogênico não foi observado para o grupo DOI-veículo no teste. Outros resultados inconsistentes quanto ao papel de receptores 5-HT_{2A} da MCP já foram reportados. Enquanto alguns autores demonstraram efeitos antiaversivos pela ativação desses receptores (NOGUEIRA; GRAEFF, 1995), outras evidências indicam um efeito pró-aversivo (MASSÉ et al., 2008).

Frente ao resultado obtido com o agonista 5-HT_{2A/2C}, o presente estudo buscou esclarecer qual o subtipo de receptor 5-HT₂ poderia estar envolvido no efeito antiaversivo do DOI. Para isso, foi conduzido um outro experimento envolvendo a injeção prévia do antagonista seletivo de receptores 5-HT_{2A} eplivanserina (CHAOULOFF; BAUDRIE; COUPRY, 1994; RINALDI-CARMONA et al., 1992, 1993, 1994; ASHWORTH et al., 1996) Muito embora pareça evidente que o tratamento prévio com eplivanserina tenha antagonizado o efeito antiaversivo do agonista DOI na reexposição, essa interpretação fica prejudicada pelo fato de os resultados do experimento 3.2 não terem sido reproduzidos quando o veículo foi administrado. O fato de o composto ter sido solúvel apenas em soluções contendo altas concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO), um veículo diferente do que utilizamos para a solubilização dos demais compostos utilizados no estudo (solução fisiológica acrescida de Tween 80 à 2%), nos levou a administrar o fármaco por via sistêmica ao invés de realizar uma injeção intra-MCPd, haja vista que alguns estudos apontam que a administração intracerebral de DMSO pode produzir alterações no comportamento, na resposta farmacológica de compostos ou na atividade metabólica encefálica em animais de laboratório (MATHEUS, LACERDA, GUIMARÃES, 1997; FOSSUM et al., 2008; NASRALLAH et al., 2008). Levando-se em consideração que o aparentemente simples procedimento de injeção intraperitoneal eleva a expressão de proteína Fos em regiões

límbicas (RYABININ et al., 1999; ASANUMA; OGAWA, 1994; CECCATELLI et al., 1989; SHARP et al., 1991), é possível que a administração de veículo pré-reteste tenha exercido alguma influência sobre o comportamento dos animais. Ainda, não se pode ignorar o fato de que os modelos animais de ansiedade baseados em conflito foram em sua maioria desenvolvidos e validados com base nos efeitos de ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos. Dessa forma, tem sido reportado que modelos como o LCE, por exemplo, são suscetíveis a mudanças climáticas e ambientais que podem prejudicar a reprodutibilidade de resultados entre laboratórios ou num mesmo laboratório, apesar dos esforços para manutenção das mesmas condições experimentais (para uma revisão ver BOURIN et al., 2007).

Outro achado importante do presente estudo foi o efeito antiaversivo produzido pelas microinfusões intra-MCPd de MK-212 (63,6 nmol) em animais expostos uma única vez ou reexpostos ao LCE. Embora menos exuberante, o efeito ansiolítico demonstrado no teste está de acordo com estudos prévios do nosso grupo que demonstraram um efeito ansiolítico pela infusão intra-MCP de mCPP, um agonista de receptores $5HT_{2B/2C}$, em camundongos expostos ao LCE, um efeito que foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento com cetanserina, um antagonista preferencial de receptores $5HT_{2A/2C}$ (NUNES-DE-SOUZA et al., 2008). Porém, o presente estudo considerou as conseqüências de uma exposição prévia ao LCE e de fato mostrou efeitos antiaversivos para a maior dose de MK-212 na reexposição. Embora não seja estatisticamente significativa, o inesperado efeito ansiolítico observado na primeira exposição para os animais do grupo veículo-MK 63,6nmol não parece ser consistente, haja vista que ambos os grupos veículo-veículo e veículo-MK 63,6 nmol tenham recebido o mesmo tratamento intra-MCPd com veículo numa primeira exposição ao LCE.

Tomados como um todo, esses resultados sugerem que, na mesma direção dos experimentos com DOI, não só a experiência no LCE é crucial para o estudo dos efeitos de drogas na reexposição, mas também a experiência com a droga em questão. Adicionalmente, esses achados dão suporte ao importante papel que os receptores 5-HT_{2C} localizados na MCP de camundongos exercem no estado emocional induzido pelo paradigma do teste e reteste no LCE.

De maneira geral, os resultados vão ao encontro da teoria do papel dual da serotonina na ansiedade dependendo da região encefálica e/ou receptor envolvido (para revisões ver DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; GRAEFF, 2004). De fato, os resultados estão de acordo com outros estudos que quase invariavelmente demonstram efeitos antiaversivos em resposta à administração intra-MCP de agonistas de receptores 5-HT₂ em ratos (para uma revisão ver DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; GRAEFF, 2004) e mais recentemente em camundongos (NUNES-DE-SOUZA et al., 2008). No entanto, exceções que questionam a consistência das propriedades antiaversivas da serotonina na MCP tem sido reportadas. Soares e Zangrossi (2004), utilizando o labirinto em T elevado (LTE) reportaram que a infusão intra-MCP de serotonina produziu efeitos opostos dependendo da tarefa envolvida – enquanto a serotonina exerceu inibição na resposta de fuga dos braços abertos (um efeito considerado como panicolítico pelos autores), a mesma facilitou a aquisição de esquiva inibitória (um efeito ansiogênico). Ambos os efeitos foram bloqueados pela administração prévia intra-MCP de cetanserina e SDZ SER 082 (um antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2C}). Dessa forma os resultados de Soares e Zangrossi (2004) dão suporte a um papel importante de ambos os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da MCP na neurobiologia do medo/ansiedade. Além disso, os resultados opostos encontrados por esses autores de certa forma corroboram os

resultados obtidos com DOI no presente estudo, no qual o tratamento intra-MCP foi antiaversivo dependendo da experiência prévia no LCE, sugerindo que ocorre uma modificação farmacológica funcional consistente com a mudança qualitativa de estado emocional após a experiência no LCE.

A fim de confirmar a participação dos subtipos de receptores 5HT_{2A} e 5-HT_{2C} da MCP nos estados emocionais induzidos pela exposição e reexposição ao labirinto em cruz elevado, seria apropriado investigar os efeitos de antagonistas específicos de receptores 5HT_{2A} (algum outro mais solúvel que a eplivanserina e que esteja disponível comercialmente) e 5-HT_{2C} microinjetados na MCP antes do DOI e MK-212 em animais com ou sem experiência prévia no LCE.

ETAPA C

3.5: Efeito do agonista 5-HT_{2A/2C} DOI intra-MCPd em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato.

Diante dos resultados obtidos com DOI no reteste no LCE juntamente com algumas teorias e evidências apontam que exposições repetidas no LCE geram um estado emocional qualitativamente diferente daquele vivenciado numa primeira experiência no aparato (HOLMES; RODGERS, 1998; DAL-CÓL et al., 2003; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003, 2004; FILE; ZANGROSSI, 1993), caracterizado como mais defensivo, a presente etapa (Etapa C) teve como objetivo avaliar o efeito do agonista 5-HT_{2A} num outro modelo animal de aversão com características aversivas iminentes, o teste de exposição ao rato (TER). Para isso, vinte e seis camundongos cuja análise histológica dos encéfalos foi positiva (veículo: n=11; DOI 8nmol: n=7; DOI 16nmol: n=8) foram utilizados para investigar os efeitos da microinjeção intra-MCPd de DOI sobre o comportamento de camundongos no LCE. Uma representação esquemática dos sítios de microinjeção na MCPd pode ser visualizada na página 50, Figura 10.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos: a descrição dos sujeitos utilizados no atual experimento é idêntica àquela já descrita no Experimento 1, vide página 29.

Drogas: DOI, nas dose de 8 e 16 nmol, foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% acrescida de 2% de Tween 80 e microinjetado no volume de 0,10µL na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral de camundongos; apomorfina (Siegfried Zofinger, Suíça) dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e

administrado por via subcutânea a ratos Long-Evans na dose de 3,0 mg/Kg 20 minutos antes de serem confinados no compartimento do predador.

Cirurgia e administração intra-MCPd de DOI: Os procedimentos foram idênticos aos descritos na página 46.

Teste de exposição ao rato (TER): O teste de exposição ao rato consiste num modelo de interação presa-predador que foi recentemente desenvolvido no laboratório dos pesquisadores Robert e Caroline Blanchard (YANG et al., 2004) com a finalidade de mensurar comportamentos de avaliação de risco em camundongos. O aparato é composto por uma caixa de acrílico transparente medindo 46 (comprimento) x 24 (largura) x 21 (altura) centímetros (caixa de exposição) coberta por uma tampa de acrílico preto. A caixa de exposição é dividida em dois compartimentos de igual tamanho (superfície e compartimento do predador) por uma tela de arame. Além disso, uma toca medindo 12 x (comprimento) x 7 (largura) x 7 (altura) centímetros e feita de acrílico preto em 3 faces e de acrílico transparente em 1 face (para permitir a filmagem) foi conectada à superfície através de um túnel de acrílico transparente (4,4cm diâmetro, 13cm comprimento – Figura 26). Os procedimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro sob a iluminação de uma lâmpada vermelha de 100 W (2 lux no nível da superfície) e consistiram em 2 fases: habituação e teste.

Fase 1. Habituação: Cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento para ambientação. Cada camundongo foi colocado na superfície da caixa de exposição por um período de 10 minutos de livre exploração sem a presença do rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal era colocada nos compartimentos superfície e toca para facilitar a

habituação. Esse procedimento foi repetido por 3 dias consecutivos. No quarto dia (dia do teste) os animais foram alocados em 3 grupos e submetidos ao procedimento de microinjeção intra-MCPd de veículo ou DOI (8 ou 16 nmol/0,1 µl em 45 segundos).

Fase 2. Teste de Exposição: No quarto dia, um rato macho Long-Evans pesando 600 g (predador) e tratado com apomorfina (3 mg/kg, s.c.. para mantê-lo em movimento durante o teste de exposição) foi introduzido no compartimento do predador. Após receberem a microinjeção das drogas ou veículo na matéria cinzenta periaquedutal dorsal, os camundongos foram colocados por cinco minutos numa gaiola de espera e, em seguida, foram introduzidos na superfície de exposição, compartimento que o separava do rato. A duração da exposição ao rato foi de 10 min para cada camundongo. Os parâmetros comportamentais registrados foram medidas espaço-temporais (frequência de entradas e tempo na toca, túnel e superfície) e etológicas. Os tempos gastos em contato com a tela de arame (incluindo escalar a tela arame) foram registrados como tempo total de contato. As medidas etológicas foram: frequência e duração de avaliação de risco (animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta a posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado) na toca, túnel ou na superfície, tempo total de congelamento (definido como ausência de movimentos que não os da respiração), de ocultação defensiva (o camundongo empurra com as patas anteriores a maravalha da toca em direção ao túnel) e do comportamento de auto-limpeza. O teste foi gravado através de um circuito filmadora-TV-DVD para análise posterior e ao final do experimento, os encéfalos foram removidos e processados para análise histológica segundo o item “Histologia”, descrito na página 48.

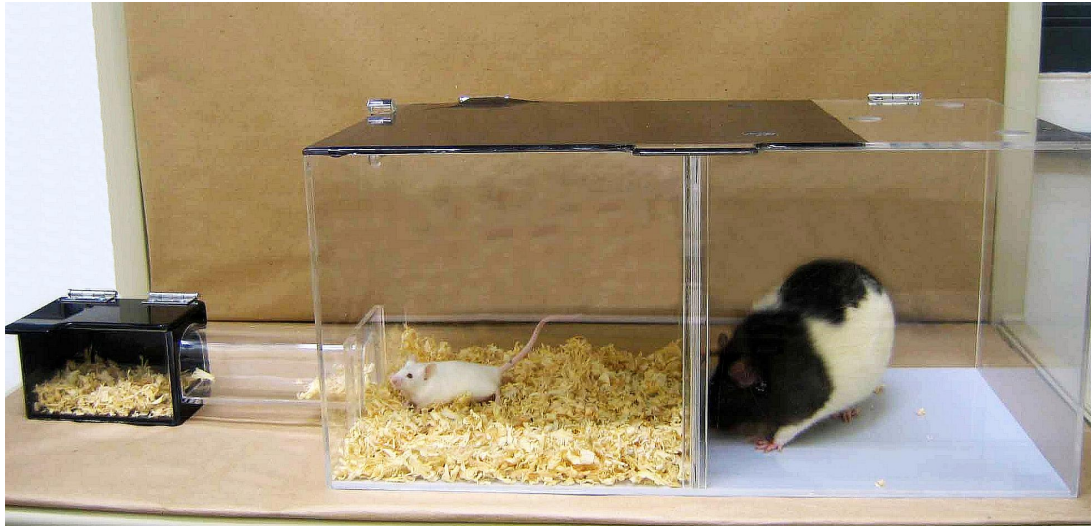


Figura 26. Aparato utilizado no teste de exposição ao rato

Estatística: Os resultados das sessões completas no TER foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um fator (tratamento intra-MCPd) seguida por testes de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de p iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos.

RESULTADOS

A Figura 27 representa as medidas espaço-temporais registradas nos 10 minutos de duração do teste de exposição ao rato.

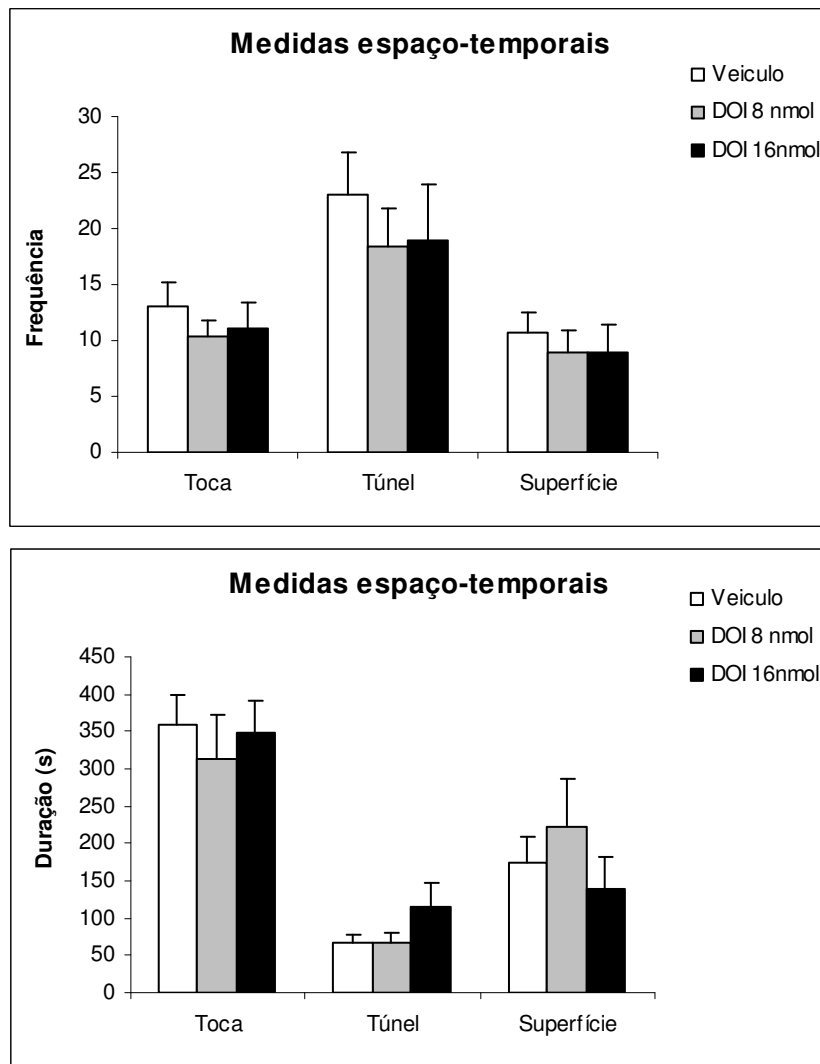


Figura 27. Frequência (painel superior) e duração (painel inferior) nos compartimentos toca, túnel ou superfície no teste de exposição ao rato. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente à exposição. Linhas: média \pm EPM. N=7-11/grupo.

A ANOVA não evidenciou nenhuma diferença significativa para frequência ou duração nos compartimentos do aparato utilizado no teste de exposição ao rato [maior valor de $F(2,23)=1,70$, $p>0,05$]. A Figura 28 representa a frequência e duração da avaliação de risco no TER.

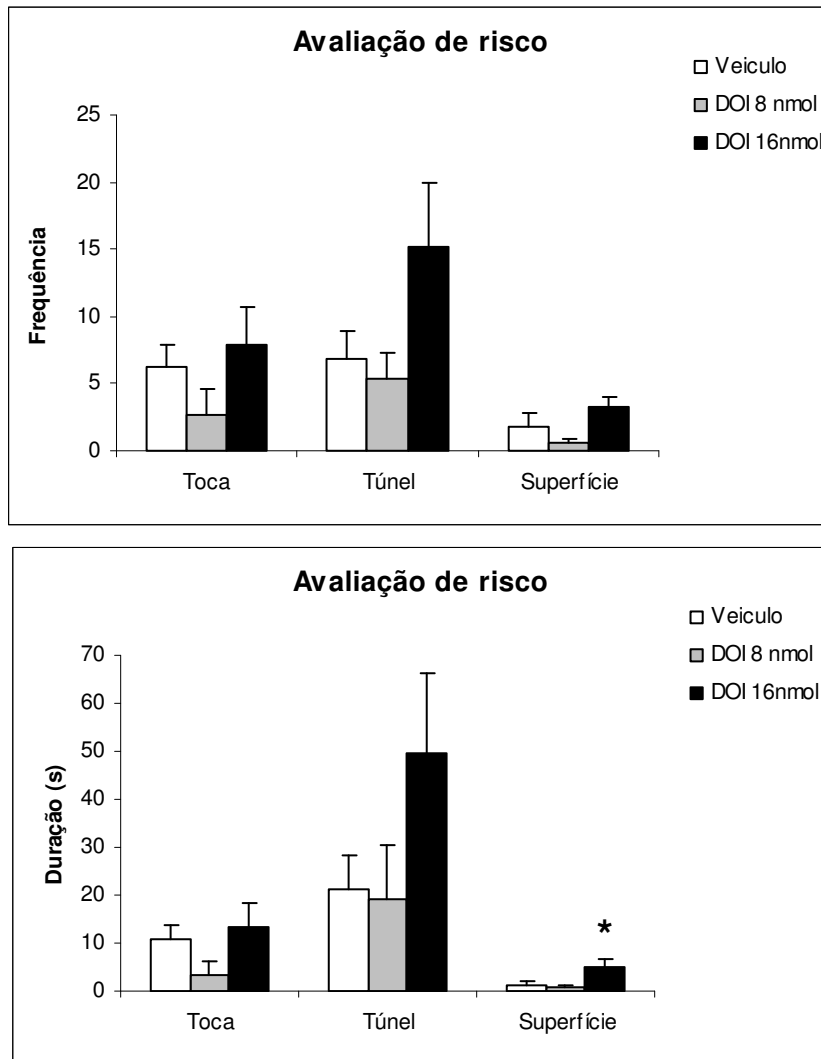


Figura 28. Frequência (painel superior) e duração (painel inferior) dos comportamentos de avaliação de risco nos compartimentos toca, túnel ou superfície no teste de exposição ao rato. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente à exposição. Linhas: média \pm EPM. N=7-11/grupo. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos veículo e DOI 8nmol na superfície.

A análise de variância demonstrou significância apenas para duração da avaliação de risco na superfície [$F(2,23)=4,48$, $p < 0,05$], sendo que o teste de Duncan confirmou um maior tempo de avaliação de risco para o grupo DOI 16nmol em comparação aos demais ($p < 0,05$). Em relação as demais medidas de avaliação de risco, ANOVA revelou um valor de P próximo da significância para frequência no túnel

[$F(2,23)=2,88$, $p=0,07$), mas nenhum efeito significativo para o fator analisado [maior valor de $F(2,23)=2,23$, $p>0,05$).

Finalmente, a Figura 29 mostra o etograma registrado na exposição de camundongos ao predador no TER.

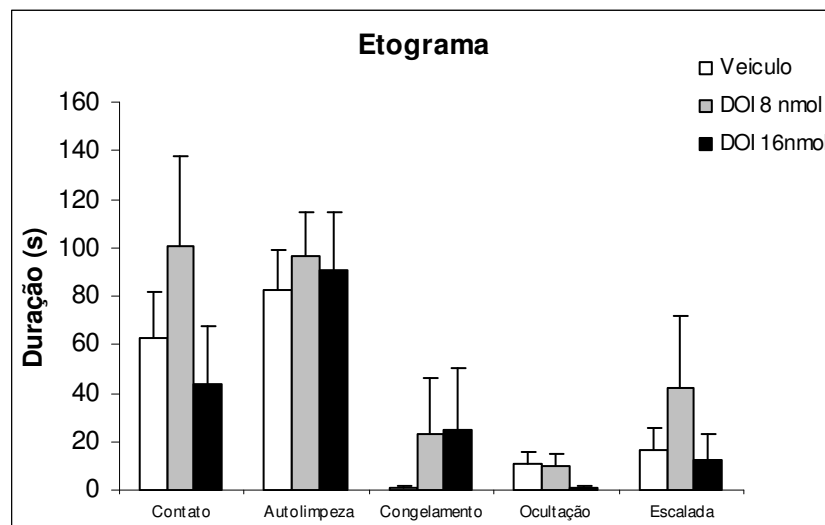


Figura 29. Etograma da duração dos comportamentos de contato, autolimpeza, congelamento, ocultação defensiva e escalada no teste de exposição ao rato. Os grupos, cujos nomes estão identificados na legenda, indicam os tratamentos intra-MCPd recebidos previamente à exposição. Linhas: média \pm EPM. $N=7-11$ /grupo.

Novamente, a ANOVA não revelou significância para o fator analisado em nenhuma das medidas registradas [maior valor de $F(2,23)=1,79$, $p>0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com DOI juntamente com algumas hipóteses que sugerem que exposições sucessivas no LCE geram um estado emocional qualitativamente diferente daquele vivenciado numa primeira experiência no aparato, nos motivaram a testar o agonista 5-HT_{2A/2C} em outro modelo de ansiedade, o teste de exposição ao rato. Diferentemente do obtido no LCE, a injeção intra-MCPd de DOI no TER não foi esclarecedora quanto ao potencial do agonista 5-HT_{2A/2C} em atenuar ou acentuar a aversão produzida pela exposição ao predador. O aumento do tempo de avaliação de risco na superfície pelo tratamento intra-MCPd com a dose de 16 nmol de DOI poderia ser interpretado como um efeito pró-aversivo. No entanto, essa hipótese é prejudicada pela ausência de efeitos desse tratamento sobre as medidas espaço-temporais. Diferentemente, outros trabalhos do nosso grupo com o mesmo modelo de ansiedade têm demonstrado que a microinjeção intra-MCPd de NMDA ou CRF ovino (agonista inespecífico de receptores CRF) aumenta o tempo na toca e diminui o tempo de contato e tempo na superfície, juntamente com uma redução da duração do comportamento de avaliação de risco no túnel ou aumento do tempo de congelamento (CARVALHO-NETTO et al., 2007; 2009). O estudo da participação de receptores serotoninérgicos no comportamento de animais confrontados com predadores não é abundante na literatura. Shepherd et al (1992), usando o modelo presa-predador conhecido como bateria de testes de defesa e ansiedade no qual ratos são confrontados com gatos, reportaram que o antagonista 5-HT_{2A/2C} ritanserina (administrado sistemicamente) não produziu alterações significativas no comportamento defensivo. Outros trabalhos também usando o paradigma de interação presa-predador mostraram que o tratamento com o antagonista 5-HT_{2A} EMD281014 ou o inibidor seletivo de recaptura de serotonina e agonista de receptores 5-HT_{1A} vilazodona antes da exposição de ratos a um gato previne o aumento

da exibição de comportamentos ansiogênicos normalmente observados uma semana após o confronto em vários modelos de ansiedade (ADAMEC; BARTOSZYK; BURTON, 2004; ADAMEC et al., 2004), sugerindo que esses compostos possuem um potencial terapêutico profilático em reduzir a hipervigilância após uma situação de estresse severo.

Os resultados obtidos com o TER vão ao encontro de exceções que questionam a consistência das propriedades antiaversivas da serotonina na MCP. Novamente pode ser citado o trabalho de Soares e Zangrossi (2004), no qual a infusão intra-MCP de serotonina produziu efeitos opostos dependendo da tarefa envolvida no labirinto em T elevado para ratos. Nesse sentido, além dos resultados opostos no presente estudo quanto a participação de receptores de serotonina da MCP em diferentes modelos animais (LCE versus TER), outros estudos conduzidos em nosso laboratório com esses modelos obtiveram resultados semelhantes. Enquanto a facilitação da transmissão gabaérgica no hipocampo ventral de camundongos foi antiaversiva no LCE, o mesmo procedimento não alterou o comportamento de camundongos expostos ao predador no TER (resultados ainda não publicados).

Em suma, os resultados mostram que o mesmo tratamento farmacológico na MCP produziu efeitos opostos em diferentes modelos animais de medo/ansiedade. Outros estudos ainda necessitam ser realizados a fim de elucidar a complexa participação dos diversos subtipos de receptores serotoninérgicos nos comportamentos de defesa exibidos diante de uma ameaça predatória.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos no experimento com diazepam evidenciaram um claro efeito ansiolítico demonstrado pelo aumento da exploração dos braços abertos do LCE, que não foi mantido em animais com experiência prévia no aparelho e que receberam diazepam na segunda exposição, confirmando vários resultados na literatura acerca da ineficácia de benzodiazepínicos nessas condições;
- O aumento nos níveis de corticosterona plasmática em camundongos com experiência prévia no LCE sugere que a reexposição gera um estado aversivo, contrariando hipóteses de que a OTT seja devido à habituação do comportamento exploratório;
- As microinfusões de DOI e MK-212, mas não de 8-OH-DPAT, na porção dorsal da MCP atenuam a aversão na reexposição ao LCE de camundongos com experiência prévia no aparelho, um efeito predominantemente observado em animais que receberam o mesmo tratamento intra-MCPd na primeira exposição. Esses achados dão suporte a um importante papel dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (mas não 5-HT_{1A}) da MCP de camundongos no estado emocional induzido pelo paradigma do teste e reteste no LCE.
- Os resultados sugerem ainda que não só a experiência no LCE é crucial para o estudo dos efeitos de drogas na reexposição, mas também a experiência com a droga em questão.
- Os resultados obtidos com a microinfusão de DOI intra-MCPd em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sugerem um efeito próaversivo contrariando a maior parte dos resultados na literatura que demonstram um papel antiaversivo da facilitação da neurotransmissão serotoninérgica nessa estrutura mesencefálica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R.; BARTOSZYK, G. D.; BURTON, P. Effects of systemic injections of vilazodone, a selective serotonin reuptake inhibitor and serotonin 1A receptor agonist, on anxiety induced by predator stress in rats. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 504, n. 1-2, p. 65-77, 2004.

ADAMEC, R.; CREAMER, K.; BARTOSZYK, G. D.; BURTON, P. Prophylactic and therapeutic effects of acute systemic injections of EMD 281014, a selective serotonin 2A receptor antagonist on anxiety induced by predator stress in rats. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 504, n. 1-2, p. 79-96, 2004.

ADAMS, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. *Behavioral and Brain Sciences*, Amsterdam, v. 2, p. 201-241, 1979.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, Amsterdam, v. 169, p. 109-118, 2008.

ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M. C.; FRANCI, C. R.; BRANDAO, M. L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Hormones and Behavior*, San Diego, v. 52, p. 267-273, 2007.

ALVES, S. H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. M. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioural Pharmacology*, Philadelphia, v. 15, n. 1, p. 37-43, 2004.

ANISMAN, H.; HAYLEY, S.; KELLY, O.; BOROWSKI, T.; MERALI, Z. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and

behavior: mouse strain-dependent outcomes. *Behavioral Neuroscience*, Washington DC, v. 115, n. 2, p.443-454, 2001.

ARMARIO, A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, Oxford, v. 5, n. 5, p. 485-501, 2006.

ASANUMA, M.; OGAWA, N. Pitfalls in assessment of c-fos mRNA expression in the brain: effects of animal handling. *Reviews in Neuroscience*, Dusseldorf, v. 5, p. 171-178, 1994.

ASHWORTH, S.; HUME, S. P.; LAMMERTSMA, A. A.; OPACKA-JUFFRY, J.; SHAH, F.; PIKE, V. W. Development of central 5-HT_{2A} receptor radioligands for PET: comparison of [3H]RP 62203 and [3H]SR 46349B kinetics in rat brain. *Nuclear Medicine and Biology*, Washington DC, v. 23, n. 3, p. 245-250, 1996.

BANDLER R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S. P. Integration of somatic autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Progress in Brain Research*, Amsterdam, v. 87, p. 269-305, 1991.

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

BARBALHO, C. A.; CANTO-DE-SOUZA, A. L.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain Research*, Amsterdam, v. 1267, p. 65-76, 2009.

BAXTER, G.; KENNETT, G.; BLANEY, F.; BLACKBURN, T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends in Pharmacological Sciences*, London, v. 16, p.105–10, 1995.

BEHBEHANI, M. M. Functional Characteristics of the Midbrain Periaqueductal Gray. *Progress in Neurobiology*, New York, v. 46, p.575-605, 1995.

BEIG, M. I.; BAUMERT, M.; WALKER, F. R.; DAY, T. A.; NALIVAICO, E. Blockade of 5-HT_{2A} receptors suppresses hyperthermic but not cardiovascular responses to psychosocial stress in rats. *Neuroscience*, Oxford, v. 159, n. 3, p. 1185-1191, 2009.

BEITZ, A. J.; CLEMENTS, J. R.; MULLET, M.; ECKLUND, L. Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, New York, v. 250, p. 498–509, 1986.

BEITZ, A. J. Central Gray. In: PAXINOS, G. (Ed.) **The human nervous system**. San Diego: Academic Press, 1990. cap. 13. p. 307-320.

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

BELCHEVA, I.; BELCHEVA, S.; PETKOV, V. V.; PETKOV, V. D. Hippocampal asymmetry in the behavioral responses to the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Brain Research*, Amsterdam, v. 640, p. 223–228, 1994.

BERTOGLIO, J.L.; ANZINI, C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; CAROBREZ, A. P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteract the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Behavioural Brain Research*, Amsterdam, v. 162, p. 99-107, 2005.

BERTOGLIO, J. L.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, Amsterdam, v. 108, p. 197-203, 2000.

BERTOGLIO, J. L.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, New York, v. 73, p. 963–969, 2002a.

BERTOGLIO, J. L.; CAROBREZ, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, Amsterdam, v. 72, p. 449-455, 2002b.

BERTOGLIO, J. L.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 170, p. 335-342, 2003.

BERTOGLIO, J. L.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. *Behavioral Pharmacology*, Oxford, v. 15, n. 1, p. 45-54, 2004.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Reviews in Psychology*, New York, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; RODGERS, R. J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggressive Behavior*, New York, v. 16, p. 165-176, 1990.

BLANCHARD, R. J.; HEBERT, M. A.; FERRARI, P. F.; PALANZA, P.; FIGUEIRA, R.; BLANCHARD, D. C.; PARMIGIANI, S. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiology and Behaviour*, New York, v. 65, n. 2, p. 201–209, 1998.

BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 21, p. 783-789, 1997.

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. *Behavioural Brain Research*, New York, v. 58, p. 155-165, 1993.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, Paris, v. 21, n. 6, p. 567-574, 2007.

BRANDÃO, M. L.; LOPEZ-GARCIA, J. A.; ROBERTS, M. H. T. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurones of the rat midbrain tectum. *Brain Research*, Amsterdam, v. 66, p. 259–266, 1991.

BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; SILVA, M. A. S.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 463, p. 225-233, 2003.

BROIZ, A. C. G.; OLIVEIRA, L. C.; BRANDÃO, M. L. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 89, p. 76-84, 2008.

CALVO-TORRENT, A.; BRAIN, P. F.; MARTINEZ, M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology and Behavior*, New York, v. 67, p. 189–96, 1999.

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

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington DC, v. 89, p. 10089-10093, 1992.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Research*, Amsterdam, v. 928, p. 50-59, 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

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

CARVALHO-NETTO, E. F.; GOMES, K. S.; AMARAL, V. C. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 204, n. 4, p. 617-625, 2009.

CARVALHO-NETTO, E. F.; LITVIN, Y.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; BLANCHARD, D. C; BLANCHARD, R. J. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. *Behavioral Brain Research*, v.176, New York, p. 222–229, 2007.

CASTILHO, V. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacology*, Berlin, v.165, p. 77–85, 2002.

CECCATELLI, S.; VILLAR, M. J.; GOLDSTEIN, M.; HÖKFELT, T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, Washington DC, v. 86, n. 23, p. 9569-9573, 1989.

CHAOULOFF, F.; BAUDRIE, V.; COUPRY, I. Effects of chlorisondamine and restraint on cortical [3H]ketanserin binding, 5-HT_{2A} receptor mediated head shakes, and behaviours in models of anxiety. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 33, p. 449–456, 1994.

CHOPIN, P.; BRILEY, M. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify serotonergic function. *Trends in Pharmacological Sciences*, New York, v. 8, p. 383-388, 1987.

CLEMENTS, J. R.; BEITZ, A. J.; FLETCHER, T. F.; MULLETT, M. A. Immunocytochemical localization of serotonin in the rat periaqueductal grey: a quantitative light and electron microscope study. *The Journal of Comparative Neurology*, New York, v. 236, p. 60–70, 1985.

CORNÉLIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, New York, v. 178, p. 82–90, 2007.

COZZI, N. V.; NICHOLS, D. E. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 309, p. 25–31, 1996.

CRUZ, A. P. M.; PINHEIRO, G.; ALVES, S. H.; FERREIRA, G.; MENDES, M.; FARIA, L.; MACEDO, C. E.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNADEZ, J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 182, p. 345–354, 2005.

DAL-CÓL, M. L. C.; ORLANDI-PEREIRA, L.; ROSA, V. P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 74, p. 395-400, 2003.

DARWIN, C. **A expressão das emoções no homem e nos animais**. São Paulo: Companhia das Letras, 2000. 384 p.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 113, p. 570-572, 1994.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, Berlin, v. 5, n. 4, p.305-315, 1991.

DHONNCHADHA, B. A. N.; BOURIN, M.; HASCÖET, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behavioral Brain Research*, New York, v.140, p. 203–214, 2003.

DHONNCHADHA, B. A. N.; HASCOET, M.; JOLLIET, P.; BOURIN, M. Evidence for a 5-HT_{2A} receptor mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behavioral Brain Research*, New York, v. 147, p.175–184, 2003.

ENGIN, E.; TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: A systematic review. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1399-1419, 2008.

ESCARABAJAL, M. D.; TORRES, C.; FLAHERTY, C. F. The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sciences*, Oxford, v. 73, n. 8, p. 1063-1074, 2003.

FACHINI, G.; REIS, L. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. L. Microinfusions of 8-OH-DPAT into the ventral hippocampus produce anxiety in the elevated plus-maze in mice. In: Abstracts of the International Behavioral Neuroscience Society, Key West, 2004. p. 49. Disponível em:

<http://www.ibnshomepage.org/ABSTbook04final061104.pdf>. Acesso em: 25 maio. 2009.

FILE, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 100, n. 2, p. 281-282, 1990.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *The Journal of Neuroscience*, Washington DC, v. 16, p. 4810–4815, 1996.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, New York, v. 19, p. 397–405, 1998.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*, New York, v. 21, p. 312–320, 1999.

FILE, S. E.; MABUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterization of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 102, p. 98-101, 1990.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. Jr.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 113, p. 543–546, 1994.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. Jr. “One-trial tolerance to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, Berlin, v. 110, p. 240-244, 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M. B.; GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, Berlin, v. 111, p. 491-494, 1993.

FORNAL, C. A.; METZLER, C. W.; GALLEGOS, R. A.; VEASEY, S. C.; MCCREARY, A. C.; JACOBS, B. L. WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Bethesda, v. 27, p. 752–762, 1996.

FOSSUM, E. N.; LISOWSKI, M. J.; MACEY, T. A.; INGRAM, S. L.; MORGAN, M. M. Microinjection of the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) into the periaqueductal gray modulates morphine antinociception. *Brain Research*, Amsterdam, v. 1204, p. 53-58, 2008.

GARCÍA, A.; MARTÍ, O.; VALLÈS, A.; DAL-ZOTTO, S.; ARMARIO, A. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, Basel, 72, n. 2, p. 114-125, 2000.

GARDNER, C. R. Recent developments in 5HT-related pharmacology of animal models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 24, p. 1479-1485, 1986.

GONZALEZ, L. E.; ADREWS, N.; FILE, S. E. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Research*, Amsterdam, v. 732, n.1-, p. 145-153, 1996.

GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E. A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*, Washington DC, v. 17, p. 1505-1511, 1997.

GRAEFF, F. G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G. D.; NOYES, R. (Ed). *Handbook of anxiety*, 3rd. ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 307-354.

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

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

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; ANDRADE, T. G. C. S.; DEAKIN, J. F. W. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 54, n. 1, p. 129–141, 1996.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 21, n. 6, 791–799, 1997.

GRAY, J. A. (Ed.) **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. London: Oxford University Press, 1982. 548 p.

GRAY, J. A.; McNAUGAHTON, N. (Ed.) **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2.ed. London: Oxford University Press, 2000. 440p.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety: more than 30 years of research. *Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v. 65, p. 319-395, 1995.

GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. Co-localization of 5-HT_{2A}-receptor- and GABA immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroscience Letters*, Clare, v. 326, p. 151–154, 2002.

HAJÓS, M.; HOFFMANN, W. E.; TETKO, I. V.; HYLAND, B.; SHARP, T.; VILLA, A. E. P. Different tonic regulation of neuronal activity in the rat dorsal raphe and medial prefrontal cortex via 5HT_{1A} receptors. *Neuroscience Letters*, Clare, v. 304, p. 129–132, 2001.

HANDLEY, S. L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v. 66, p. 103-148, 1995.

HANDLEY, S. L.; McBLANE, J. W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 112, p. 13-20, 1993.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonist in a maze-exploration model of “fear-motivated behaviour”. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, New York, v. 327. p. 1-5, 1984.

HASCÖET, M.; BOURIN, M.; COUETOUX DU TERTRE, A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 58, p. 1131–1138, 1997.

HERMAN, J. P.; OSTRANDER, M. M.; MUELLER, M. K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, Oxford, v. 29, p. 1201 – 1213, 2005.

HESS, W. R.; BRÜGGER, M. Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaktion. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta*, Basel, v. 1, p. 33-52, 1943.

HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 107-132.

HOLMES, A.; ILES, J. P.; MAYELL, S. J.; RODGERS, R. J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behavioral Brain Research*, New York, v. 122, p. 159–167, 2001.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 60, p. 473-488, 1998.

IKEMOTO, S.; PANKSEPP, J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Research*, Amsterdam, v. 31, p. 6-41, 1999.

IVERSEN, S. D. 5-HT and anxiety. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 23, p. 1553-1560, 1984.

IZUMI, T.; SUZUKI, K.; INOUE, T.; LI, X. B.; MAKI, Y.; MURAKI, I. Longlasting change in 5-HT_{2A} receptor-mediated behavior in rats after a single footshock. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 452, p.199–204, 2002.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 92, p. 180-185, 1987

KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 25, p. 117-142, 2001.

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

LOVICK, T. A. Serotonergic influence from nucleus raphe obscurus on neurones in the periaqueductal grey matter in the rat. *Brain Research*, Amsterdam, v. 606, p. 92–98, 1993.

LOVICK, T. A.; PARRY, D. M.; STEZHKA, V. V.; LUMB, B. M Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience*, Oxford, v. 95, p. 763–772, 2000.

MAGOUN, H. W.; ATLAS, D.; INGERSOLL, E. H; RANSOM , S. W. Associated facial, vocal and respiratory components of emotional expression: An experimental study. *The Journal of neurology and psychopathology*, Oxford, v. 17, p. 241-255, 1937.

MANTHY, P. H. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a nissl, weiss and golgi analysis. *The Journal of comparative neurology*, New York, v. 204, p. 146-158, 1982.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology and Behavior*, New York, v. 90, p. 29–35, 2007.

MÁRQUEZ, C.; BELDA, X.; ARMARIO, A. Post-stress recovery of pituitary–adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Research*, Amsterdam, v. 926, p. 181–185, 2002.

MARKS, I. M. **Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders**. New York: Oxford University Press, 1987. p. 53-81

MARTINEZ, R. C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTERAS, N. S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behavioral Brain Research*, New York, v. 192, n. 2, p. 185–190, 2008.

MASSÉ, F.; DHONNCHADHA, B. A. N.; HASCÖET, M.; BOURIN, M. Anxiolytic-like effect of 5-HT₂ ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of anxiety (the four-plate test and the elevated plus-maze). *Behavioral Brain Research*, Amsterdam, v. 177, p. 214-226, 2007.

MASSÉ, F.; HASCÖET, M.; DAILLY, E.; BOURIN, M. Effect of noradrenergic system on the anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 183, p. 471-481, 2006.

MASSÉ, F.; HASCÖET, 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. *European Neuropsychopharmacology*, Amsterdam, v. 17, p. 483-491, 2007.

MASSÉ, F.; PETIT-DEMOULIERE, B.; DUBOIS, I.; HASCÖET, M.; BOURIN, M. Anxiolytic-like effect of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four plates test. *Behavioral Brain Research*, New York, v. 188, n. 2, p. 291-297, 2008.

MATHEUS, M. G.; LACERDA, J. C.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects of “vehicle” microinjected into the dorsal periaqueductal grey of rats tested in the elevated plus maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 61-64, 1997.

McGREGOR, I. S.; DIELENBERG, R. A. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 147, p. 174–181, 1999.

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

MENARD, J.; TREIT, J. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 23, p. 591-613, 1999.

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

MORA, P. O.; NETTO, C. F.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 58, n. 4, p. 1051-1057, 1997.

MESSIER, C.; ÉMOND, S.; ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 63, n. 2, p. 313-318, 1999.

MUNDEY, M. K.; FLETCHER, A.; MARSDEN, C. A. Effects of 8-OHDPAT and 5-HT_{1A} antagonists WAY100135 and WAY100635, on guinea-pig behaviour and dorsal raphe 5-HT neurone firing. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 117, p. 750–756, 1996.

NASHOLD, B. S. Jr.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery*, Charlottesville, v. 30, n. 1, p. 14-24, 1969.

NASRALLAH, F. A.; GARNER, B.; BALL, G. E.; RAE, C. Modulation of brain metabolism by very low concentrations of the commonly used drug delivery vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO). *Journal of Neuroscience Research*, New York, v. 86, n. 1, p. 208-214, 2008.

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

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. L.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R. V.; PELÁ, I. R.; GRAEFF, F. G. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 150, p. 300–310, 2000.

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

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

O'BOYLE, M. Rats and mice together: the predatory nature of the rat's mousekilling response. *Psychology Bulletin*, Washington DC, v. 81, p. 261–269, 1974.

O'BOYLE, M. The rat as a predator. *Psychology Bulletin*, Washington DC, v. 82, p. 460–462, 1975.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 2.ed. 2001.

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

PEREIRA, J. K.; VIEIRA, R. J.; KONISHI, C. T.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. The phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sciences*, Oxford, v. 65, n. 10, p. 101–107, 1999.

PIERCE, P. A.; PEROUTKA, S. J. Hallucinogenic drug interactions with neurotransmitter receptor binding sites in human cortex. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 97, p. 118–122, 1989.

PORTER, R. H.; BENWELL, K. R.; LAMB, H.; MALCOLM, C. S.; ALLEN, N. H.; REVELL, D. F. Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *British Journal of Pharmacology*, London, v. 128, p. 13–20, 1999.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. *Science*, New York, v. 164, p. 444-445, 1969.

RINALDI-CARMONA, M.; BOUABOULA, M.; CONGY, C.; OURY-DONAT, F.; SIMIAND, J.; SHIRE, D.; CASELLAS, P.; SOUBRIÉ, P.; BRELIÈRE, J. C.; LE FUR, G. Up-regulation of 5-HT₂ receptors in the rat brain by repeated administration of SR 46349B, a selective 5-HT₂ receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 73-80, 1993.

RINALDI-CARMONA, M.; CONGY, C.; SANTUCCI, V.; SIMIAND, J.; GAUTRET, B.; NELIAT, G.; LABEEUW, B.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P.; BRELIÈRE, J. C. Biochemical and pharmacological properties of SR 46349B, a new potent and selective

5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Bethesda, v. 262, n. 2, p. 759-768, 1992.

RINALDI-CARMONA, M. ; CONGY, C. ; POINTEAU, P. ; VIDAL, H. ; BRELIÈRE, J. C. ; LE FUR, G. Identification of binding sites for SR 46349B, a 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sciences*, Oxford, v. 54, n. 2, p. 119-127, 1994.

RIPOLL, N.; DHONNCHADHA B. A. N.; SEBILLE, V.; BOURIN, M.; HASCÖET, M. The four-plates test-retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology*, Berlin, v.180, p.73–83, 2005.

RIPOLL, N.; HASCÖET, M.; BOURIN, M. Implication of 5-HT_{2A} subtype receptors in DOI activity in the four-plates test-retest paradigm in mice. *Behavioral Brain Research*, New York, v. 166, p. 131-139, 2006.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. (Ed.). **Ethology and Psychopharmacology**. Cichester: Wiley, 1994. p. 9-44.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, J.C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 54, n. 1, p. 41-50, 1996.

RODGERS R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology and Behavior*, New York, v. 68, p. 47–53, 1999.

RODGERS, R. J.; LEE, C.; SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 106, n. 1, p.102-110, 1992.

ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, Oxford, v. 25, p. 213–238, 2000.

RYABININ, A. E.; WANG, Y. M.; FINN, D. A. Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 63, n. 1, p. 143-151, 1999.

SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V. A.; MORATO, S.; CRUZ, A. P. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 62, n. 3, p. 515-521, 1999.

SEWARDS, T. V.; SEWARDS, M. A. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 26, p. 553-579, 2002.

SHARP, R. L.; SAGAR, S. M.; HICKS, K.; LOWENSTEIN, D.; HISANAGA, K. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related Antigen Induction by Hypertonic Saline and Stress. *The Journal of Neuroscience*, Washington DC, v. 11, n. 8, p. 2321-2331, 1991.

SHEPHERD, J. K.; FLORES, T.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. The anxiety/defense test battery: influence of gender and ritanserin treatment on antipredator defensive behavior. *Physiology and Behavior*, New York, v. 51, n. 2, p. 277-285, 1992.

SOARES, V. P.; ZANGROSSI, H. Jr. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, Oxford, v. 64, n. 2, p. 181-188, 2004.

STERN, C. A.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, New York, v. 90, n. 4, p. 545-550, 2008.

TITELER, M.; LYON, R. A.; GLENNON, R. A. Radioligand binding evidence implicates the brain 5-HT₂ receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 94, p. 213–216, 1988.

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

VAIDYA, V. A.; TERWILLIGER, R. M.; DUMAN, R. S. Role of 5-HT_{2A} receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, Clare, v. 262, p.1–4, 1999.

VARGAS, K. M.; CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Amphetamine and pentylenetetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, Oxford, v. 30, p. 1394–1402, 2006.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, New York, v. 407, p. 555-582, 1999.

YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, C.; HUBBARD, D. T.; WEBSTER, D.; WALL, P. M.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology and Behavior*, New York, v. 81, n. 3, p. 465-473, 2004.

WU, J.; KRAMER, G. L.; KRAM, M.; STECIUK, M.; CRAWFORD, I. L.; PETTY, F. Serotonin and learned helplessness: a regional study of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors and the serotonin transport site in rat brain. *Journal of Psychiatry Research*, Oxford, v. 33, p.17–22, 1999.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of intraamygdala injections of GABA and 5 HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.27, p. 2453–2456, 1994.

APÊNDICE

Ms. Ref. No.: PNP-D-09-00124R3

Title: Implication of the 5-HT2A and 5-HT2C (but not 5HT1A) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Dear Associate Professor Ricardo Luiz Nunes-de-Souza,

I am pleased to confirm that your paper "Implication of the 5-HT2A and 5-HT2C (but not 5HT1A) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice" has been accepted for publication in Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Guy Drolet

Editorial Office

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Comments from the Editors and Reviewers:

Reviewer #1: No further comments.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Title page

Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice

Authors:

Karina Santos Gomes (GOMES K. S.) **a,b,c**
Ricardo Luiz Nunes de Souza* (NUNES-DE-SOUZA, R. L.) **b,c**

Address:

a Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, FFCLRP-Campus USP, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brasil
b Laboratório de Neuropsicofarmacologia, FCFAr-Campus UNESP, Araraquara, SP, 14801-902, Brasil
c Instituto de Neurociências & Comportamento - INeC, Campus USP, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brasil

*** Corresponding author:**

Tel: +55 -16-33016985
Fax: +55 -16-33016980
e-mail address: souzar@fcfar.unesp.br (R. L. Nunes-de-Souza)

1. Abstract

A single exposure to the elevated plus-maze test (EPM) increases open arms avoidance and reduces or abolishes the anxiolytic-like effect of benzodiazepines assessed during a second Trial, a phenomenon defined as "one trial tolerance" (OTT). It has been emphasized that the dorsal portion of the midbrain periaqueductal gray (dPAG) plays a role on this enhanced aversion phenomenon in maze-experienced rodents. Given that intra-dPAG injections of a wide range of serotonergic 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor agonists produce anxiolytic-like effects in maze-naïve rodents, the present study examined the effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (5.6 and 10.0 nmol in 0.15 µl) the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI (2.0 and 8.0 nmol in 0.1µl) and the preferential 5-HT_{2C} receptor agonist MK-212 (21.2 and 63.6 nmol in 0.1µl) microinjected into the dPAG prior to Trial 1 and Trial 2 on the behaviour of mice in the EPM. Test sessions were recorded and subsequently scored for anxiety-like behaviour (percentage of open arms entries and time) as well as general locomotor activity (closed arm entries). The results showed a lack of 8-OH-DPAT (5.6 and 10.0nmol) effect on the behaviour of maze-naïve and maze-experienced mice, while intra-dPAG microinfusions of DOI (8nmol) reduced anxiety-like behaviour only in maze-experienced mice that had received a similar treatment prior to Trial 1. Furthermore, intra-dPAG MK-212 (63.6nmol) showed an anxiolytic-like effect on both Trial 1 and Trial 2. Importantly, these effects were observed in the absence of any significant change in closed arm entries, the parameter considered to be a valid index of locomotor activity in the plus-maze. These results support the dPAG as a crucial structure involved in the neurobiology of the OTT phenomenon as well as accounting the role of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors located within this midbrain structure on the emotional state induced by EPM test and retest paradigm mice.

Key Words: 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors; elevated plus-maze; mice; one-trial tolerance; periaqueductal gray

Abbreviations

%OE, percentage of open arms entries; %OT, percentage of open arms time; dPAG, dorsal periaqueductal gray matter; EPM, elevated plus-maze; MRN, median raphe nucleus; OTT, one-trial tolerance

1. Introduction

The elevated plus-maze (EPM) is one of the most popular animal models of anxiety currently in use. The test, validated for rats (Handley and Mithani, 1984; Pellow et al., 1985) and mice (Lister, 1987), is based on the natural aversion of rodents to open spaces which leads to a conflict between the exploration and avoidance to the open arms. Rodents tested in the EPM display a characteristic increase in open arms exploration after the administration of anxiolytic-like drugs. However, when the subjects have already performed an EPM task, they rather show increased open arms avoidance and no longer respond to anxiolytics in a subsequent exposure (for a review see Carobrez and Bertoglio, 2005). The lack of anxiolytic-like effects in maze-experienced rodents was initially observed for the benzodiazepine chlordiazepoxide and referred to as “one-trial tolerance” (OTT; File et al., 1990). Considerable efforts have been attempted to either explain or prevent the OTT phenomenon. Several hypothesis have been proposed, such as locomotor habituation (Dawson et al. 1994), an altered state of the binding-site on the receptors involved (Gonzales and File, 1997; Bertoglio and Carobrez, 2002a, 2002b, 2003), an experimentally induced sensitization of fear/anxiety (Treit et al. 1993, Bertoglio and Carobrez, 2000), a qualitative shift in the emotional state between trials, from an unconditioned fear response to a learned avoidance (Holmes and Rodgers, 1998; Dal-Cól et al. 2003; Bertoglio and Carobrez, 2003, 2004; File and Zangrossi, 1993) and/or activation of cognitive-related telencephalic structures involved in the control of learned fear (Albrechet-Souza et al. 2008). Interestingly, the OTT phenomenon is not exclusive to the EPM model, being also described for light-dark transition test (Holmes et al. 2001), predator-odor exposure test (McGregor and Dielenberg, 1999) and the four-plates test (Hascöet et al. 1997).

Regarding the prevention of the OTT, it was demonstrated that rodents continue to display anxiolytic-like behaviours in response to drugs on Trial 2 when (1) a new motivational conflict was introduced during the task (Pereira et al. 1999), (2) the Trial 1 length in the EPM was limited to 1-minute exposure (Dal-Cól et al. 2003), (3) amnesic doses of chlordiazepoxide (File et al. 1990), scopolamine (Bertoglio and Carobrez, 2004) or propranolol (Stern et al. 2008) were administered prior to Trial 1, (4) systemic 5-HT_{2A}

1
2
3 receptor agonists were administered prior to Trial 2 (observed in the four-plates test)
4 (Ripoll et al. 2006) and (5) intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist
5 and antagonist were conducted prior to Trial 2 (Barbalho et al. 2009).
6
7

8 Additionally, studies aimed to elucidate which brain structures related to
9 fear/defense system could be candidates to modulate the lack of a drug's anxiolytic-like
10 effect on Trial 2 have shown that deactivation of basolateral amygdala (after Trial 1),
11 dorsomedial hypothalamus (before Trial 2) and periaqueductal gray matter (before Trial 2
12 but not pre or post-Trial 1) reinstate the anxiolytic-like effect of a benzodiazepine (File et
13 al. 1998, 1999; Bertoglio et al. 2005). Although few studies have attempted to investigate
14 the role of brain structures in the OTT phenomenon, these findings strongly suggest that
15 the shift in the defensive strategies adopted by maze-experienced rodents on a subsequent
16 exposure to the EPM is accompanied by different set of brain structures required to
17 control the different emotional states experienced on both trials. Altogether, these
18 findings support a central role of the PAG, amygdala and the dorsomedial hypothalamus
19 in the emotional state experienced on Trial 2 task. However, it is important to emphasize
20 that temporary deactivation of both dorsomedial hypothalamus (Shekhar 1993) or
21 basolateral amygdala (Moreira et al. 2007) also attenuates anxiety-like behavior in EPM-
22 naïve rats. Moreover, a recent c-fos study conducted to map the neural substrate on Trial
23 1 and Trial 2 in the EPM has demonstrated no changes in the fos-like immunoreactivity
24 either at the PAG or hypothalamus in rats (Albrechet-Souza et al., 2008).
25
26

27 Previous findings from our group showed that infusions of WAY-100635, a
28 selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, into the median raphe nucleus (MRN) attenuate
29 anxiety in maze-experienced mice (Canto-de-Souza et al. 2002). Since WAY-100635
30 would be expected to increase the firing rate of raphe neurons by blocking
31 somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors (Fornal et al. 1996; Hajós et al. 2001; Munday et
32 al. 1996), its anxiolytic-like effects when applied to the MRN are most probably due to
33 disinhibition of 5-HT release at distant postsynaptic targets. Canto-de-Souza et al. (2002)
34 further argued that the anxiolytic-like response to intra-MRN injection of WAY-100635
35 could not be explained by increased 5-HT activity at 5-HT_{1A} or 5-HT₂ receptors in the
36 hippocampus or amygdala, since such actions are known to exert anxiogenic-like effects
37 in rats (Alves et al. 2004; Cruz et al. 2005) and mice (Conélio and Nunes-de-Souza,
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 2007; Nunes-de-Souza et al. 2000, 2002). It is important to address that the literature
4 regarding the role of serotonin receptors located within hippocampus and amygdala is
5 conflicting due to several reasons such as species and animal models used, infusion target
6 and drug selectiveness (for a review see Engin and Treit, 2008). For example, in rats 8-
7 OH-DPAT microinfusion into the amygdala attenuated aversion in the elevated T maze
8 avoidance task (Zangrossi et al. 1999), but failed to change anxiety-like behaviors in the
9 EPM when injected either into the amygdala or the ventral hippocampus (VH) (File and
10 Gonzalez, 1996; Gonzalez et al. 1996; Zangrossi and Graeff, 1994). In mice, 8-OH-
11 DPAT microinfusion into the amygdala (Nunes-de-Souza et al. 2000) or VH (Fachini et
12 al. 2004) enhanced anxiety in the EPM. Regarding 5-HT₂ receptors agonists in
13 amygdala, while studies performed in rats have either shown an anxiolytic-like action or
14 a lack of effect (Duxon et al. 1995), in mice an anxiogenic-like effect has been reported
15 (Cornelio and Nunes-de-Souza, 2007). In the VH it has been demonstrated a lack of
16 mCPP effects in mice in the EPM (Cornelio and Nunes-de-Souza, 2007), whereas MK-
17 212 (a more selective 5-HT_{2C} agonist) in rats produced anxiogenic-like effects (Alves et
18 al. 2004).

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 However, the MRN also projects to the mesencephalic PAG (Vertes et al. 1999), a
32 structure rich in 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptor subtypes (Clements et al. 1985; Beitz et al.
33 1986; Lovick et al. 2000; Brandão et al. 1991; Lovick 1993; Griffiths and Lovick, 2002)
34 and where local serotonergic activation generally produces anti-aversive effects in rats
35 (for review, see Deakin and Graeff, 1991; Graeff et al. 1996, 1997; Graeff 2002, 2004).
36 Indeed, the hypothesis that the anxiolytic-like effect of microinfusions of WAY-100635
37 into the MRN is due to a facilitation on the serotonergic transmission within the PAG is
38 supported by recent results reported by Nunes-de-Souza et al. (2008) in which
39 microinfusions of the 5-HT₂ receptors agonist mCPP within PAG reduced anxiety-like
40 behaviour in mice exposed to the elevated plus-maze. Importantly, this latter study did
41 not account for the consequence of a previous maze experience in the evaluation of intra-
42 PAG microinfusion of mCPP. To investigate the potential involvement of 5-HT_{1A} and 5-
43 HT₂ receptors within the PAG in the enhanced fear induced by previous maze
44 experience, the present study examined the effect of 8-OH-DPAT (a 5-HT_{1A} receptor
45 agonist), DOI (a preferential 5-HT_{2A} receptor agonist) and MK-212 (a 5-HT_{2C} receptor
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 agonist) microinjected into the dorsal portion of the PAG (dPAG: dorsolateral and
4 dorsomedial columns) prior to Trial 1 and Trial 2 on behavior of mice in the elevated
5 plus-maze.
6
7
8
9

10 **2. Materials and methods**

11 **2.1. Animals**

12
13
14
15
16
17
18 Subjects were 279 male Swiss adult mice (Sao Paulo State University/UNESP, SP,
19 Brazil), weighing 28–35 g at testing. They were housed in groups of 4 per cage (41
20 cm×34 cm×16 cm) and maintained under a normal 12-h light cycle (lights on 07:00 h) in
21 a temperature/humidity-controlled environment (23±1 °C/55±5 %). Food and water were
22 freely available except during the brief test periods. All mice were naïve at the beginning
23 of experiments.
24
25
26
27
28

29 **2.2 Drugs**

30
31
32
33
34
35 The drugs used were 8-OH-DPAT [(±)-8-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin
36 hydrobromide; Tocris Cookson Inc., USA), a preferential 5-HT_{1A} receptor agonist, DOI
37 (±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride; Sigma, USA], the
38 most selectively 5-HT_{2A} receptors agonist available (Pierce and Petrouka, 1989; Titeler
39 et al. 1988; Porter et al. 1999) and MK-212 (6-Chloro-2-(1-piperazinyl)pyrazine
40 hydrochloride; Tocris Cookson Inc., USA), a preferential 5-HT_{2C} receptors agonist. The
41 compounds were dissolved in physiological saline added with 2% Tween 80, which alone
42 served as vehicle solution. The doses of 8-OH-DPAT (5.6 and 10 nmol), DOI (2 and 8
43 nmol) and MK-212 (21.2 and 63.6 nmol) were based in previous studies (Nogueira and
44 Graeff 1995; Fachini et al. 2004; Alves et al. 2004) and pilot works from our laboratory.
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **2.3 Surgery and microinjection**

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Mice were implanted with 7-mm stainless steel guide cannula (26-gauge; Insight
4 Equipamentos Científicos Ltda) under ketamine + xylazine anesthesia (100 mg/kg and 10
5 mg/kg, i.p.) in a stereotaxic frame (Kopf Instruments). Guide cannula was fixed to the
6 skull using dental acrylic and jeweler's screws. Stereotaxic coordinates (Paxinos and
7 Franklin, 2001) for the dorsal portion of the PAG (dPAG: dorsolateral and dorsomedial
8 columns) were 4.1 mm posterior to bregma, 1.4 mm lateral to the midline, and 2.3 mm
9 ventral to the skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical. A dummy
10 cannula (33-gauge stainless steel wire; Fishtex Industry and Commerce of plastics Ltda.),
11 inserted into each guide-cannula immediately after of surgery, served to reduce the
12 incidence of occlusion. Postoperative analgesia was provided for 2 days by adding
13 acetaminophen (200 mg/ml) to the drinking water in a ratio of 0.2 ml acetaminophen:250
14 ml water (i.e., final concentration = 0.16 mg/ml) (Messier et al. 1999). Five to seven days
15 after surgical recovery, solutions were injected into the dPAG by microinjection units
16 (33-gauge stainless steel cannula; Insight Equipamentos Científicos Ltda), which
17 extended 1.0 mm beyond the tips of the guide cannula. Each microinjection unit was
18 attached to a 5- μ l Hamilton microsyringe via polyethylene tubing (PE-10), and
19 administration was controlled by an infusion pump (BI 2000, Insight Equipamentos
20 Científicos Ltda) programmed to deliver a volume at rate of 0.1 μ l (volume injected) over
21 a period of 45 s (except for 8-OH-DPAT which final volume injected was 0.15 μ l due to
22 its lower solubility). The microinjection procedure consisted of gently restraining the
23 animal, removing of dummy cannula, inserting the injection unit, infusing the solution,
24 keeping the injection unit in situ for a further 60 s. Confirmation of successful infusion
25 was obtained by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **2.4 Apparatus and general procedure**

46
47 The basic EPM design was very similar to that originally described by Lister (1987) and
48 comprised two open arms (30 cm x 5 cm x 0.25 cm) and two closed arms (30 cm x 5 cm
49 x 15 cm) connected via a common central platform (5 cm x 5 cm). The apparatus was
50 constructed from wood (floor) and transparent glass (clear walls) and was raised to a
51 height of 38.5 cm above floor level. All testing were conducted under dim illumination
52 (1 X 60W white light or 55 lux at the central platform of the EPM) during the light phase
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 of the light-dark cycle. Five to 6 days after surgery, mice were transported to the
4 experimental room and left undisturbed for at least 60 min prior to testing. Immediately
5 following microinfusion of 8-OH-DPAT (5.6 or 10 nmol), DOI (2 or 8 nmol), MK-212
6 (21.2 or 63.6 nmol) or vehicle into the dPAG, each mouse was individually placed in a
7 holding cage for 5 min and then transported to the EPM. Testing commenced by placing
8 the subject on the central platform of the maze (facing an open arm), following which
9 the experimenter immediately withdrew to an adjacent laboratory. Test sessions lasted 5
10 min and, between subjects, the maze was thoroughly cleaned with 20 % ethanol and dry
11 clothes. All sessions were video-recorded by a camera linked to a monitor and DVD in
12 an adjacent laboratory. 24 h later (Trial 2), maze and drug-experienced mice from each
13 group were randomly allocated into other groups, according to the intra-dPAG pre-Trial
14 1 and pre-Trial 2 treatments, as follow: vehicle-vehicle, vehicle-8-OH-DPAT, vehicle-
15 DOI, vehicle-MK-212, 8-OH-DPAT-vehicle, DOI-vehicle, MK-212-vehicle, 8-OH-
16 DPAT-8-OH-DPAT, DOI-DOI and MK-212-MK-212. The experimental conditions
17 were the same described for Trial 1. The rationale for injecting vehicle in the Trial 1 and
18 drug in the Trial 2 was to investigate a possible effect of the drug on the expression of
19 aversion. On the other hand, groups injected with drug on Trial 1 and vehicle on Trial 2
20 were needed to investigate the drug effects on learning processes. The drug-drug groups
21 were included in the experimental design in order to investigate whether the drug effect
22 on Trial 2 depends on the drug state on Trial 1.

2.5 Behavioral analysis

23
24 Behavioral analysis was performed as described elsewhere (Nunes-de-Souza et al.
25 2008). Videotapes were scored blind to treatment by a highly trained observer using an
26 ethological analysis software package developed by Dr. Morato's group at Faculdade de
27 Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Brazil (unpublished). Behavioral
28 parameters comprised conventional spatiotemporal measures (Rodgers and Johnson,
29 1995). Conventional measures were the frequencies of closed arm entries (arm entry =
30 all four paws into an arm), percentage open entries $((\text{open}/\text{total}) \times 100)$, and percentage of
31 time spent in open parts of the maze $((\text{time open}/300) \times 100)$.

2.6 Histology

At the end of testing, all animals received a 0.1µl infusion of 1% Evans blue, according to the microinjection procedure described above. The animals were then sacrificed under anesthetic overdose, their brains removed and injection sites verified histologically according to the atlas of Paxinos and Franklin (2001). Data from animals with injection sites outside the PAG were excluded from the study.

2.7 Statistics

Statistics comprised two-way repeated measures ANOVA (treatment x trial) followed by post-hoc Duncan test. Additionally, the locomotor activity (closed arm entries) and the anxiety indices (% open arms entries and % open arms time) data from each trial were submitted to single-factor ANOVA (treatment) to assess between-groups differences intra-trial 1 and intra-trial 2. Where indicated by significant F values, Duncan's multiple comparisons test were used. Additionally a related Student's *t* test was also performed in order to compare the anxiety indices for the groups vehicle-vehicle on Trial 1 versus Trial 2. In all cases, a P value ≤ 0.05 was required for significance.

2.8 Ethics

The experiments carried out in this study are in compliance with the norms of Brazilian Neuroscience and Behavior Society (SBNeC), based on the US National Institutes of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals.

3. Results

3.1. Histology

Histology confirmed that a total of 279 mice had accurate cannula placements in the PAG (Fig. 1). Injection sites were predominantly (approximately 85%) in the dorsal portion (i.e., dorsomedial and dorsolateral columns) of the PAG (dPAG). One-hundred mice were used to investigate the effects of intra-PAG 8-OH-DPAT on anxiety-like behaviour [Experiment 1; vehicle-vehicle ($n = 26$), vehicle-8-OH-DPAT 5.6 nmol ($n =$

1
2
3 13), vehicle-8-OH-DPAT 10.0 nmol ($n = 12$), 8-OH-DPAT 5.6 nmol-vehicle ($n = 12$), 8-
4 OH-DPAT 10.0 nmol-vehicle ($n = 12$), 8-OH-DPAT-8-OH-DPAT 5.6 nmol ($n = 14$), 8-
5 OH-DPAT-8-OH-DPAT 10.0 nmol ($n = 11$)]. Ninety nine mice were used to investigate
6 the effects of intra-PAG DOI on anxiety-like behaviour [Experiment 2; vehicle-vehicle
7 ($n = 19$), vehicle-DOI 2.0 nmol ($n = 13$), vehicle-DOI 8.0 nmol ($n = 13$), DOI 2.0 nmol-
8 vehicle ($n = 12$), DOI 8.0 nmol-vehicle ($n = 11$), DOI-DOI 2 nmol ($n = 19$), DOI-DOI
9 8.0 nmol ($n = 12$)]. Finally, 80 mice were used to investigate the effects of MK-212
10 [Experiment 3; vehicle-vehicle ($n = 15$), vehicle-MK-212 21.2 nmol ($n = 12$), vehicle-
11 MK-212 63.6 nmol ($n = 8$), MK-212 21.2 nmol-vehicle ($n = 14$), MK-212 63.6 nmol-
12 vehicle ($n = 9$), MK-212-MK-212 21.2 nmol ($n = 9$), MK-212-MK-212 63.6 nmol ($n =$
13 13)].
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **3.2 Effects of intra-PAG 8-OH-DPAT injected pre-Trial 1 and pre-Trial 2.**

24
25
26 As summarized in Figure 2, intra-dPAG infusions of 8-OH-DPAT (5.6 or 10
27 nmol/0.15 μ l) did not significantly affect the conventional measures of anxiety in the
28 EPM (percentage open entries (%OE): $F(6,93) = 0.74$; $p > 0.05$; percentage open time
29 (%OT): $F(6,93) = 1.21$, $p > 0.05$). Two-way ANOVA revealed a significant trial effect
30 for both %OE and %OT ($F(1,93) = 21.78$, $p < 0.05$ and $F(1,93) = 29.34$, $p < 0.05$,
31 respectively) but no significant effect for treatment x trial interaction (%OE: $F(6,93) =$
32 0.66 , $p > 0.05$; %OT: $F(6,93) = 0.51$, $p > 0.05$). Treatment effect was revealed for closed
33 arm entries ($F(6,93) = 2.31$, $p < 0.05$) but no significant effect for trial factor ($F(1,93) =$
34 1.53 , $p > 0.05$) or treatment x trial interaction ($F(6,93) = 0.24$, $p > 0.05$). Importantly, a
35 reduction in open arms exploration for the group vehicle-vehicle on Trial 2 versus Trial
36 1 was confirmed by the paired Student's t test [%OE: $t(25) = 4.01$, $p < 0.05$; %OT: $t(25) =$
37 3.87 , $p < 0.05$]. Moreover, post hoc comparisons did not reveal any change in closed arm
38 entries, except for the 8-OH-DPAT 5.6 nmol-vehicle group which exhibited higher
39 general locomotor activity when compared to other groups ($p < 0.05$), except the 8-OH-
40 DPAT-8-OH-DPAT 5.6 nmol and 8-OH-DPAT-8-OH-DPAT 10 nmol groups. Intra-trial
41 1 or intra-trial 2 single factor ANOVA for closed arm entries, %OE and %OT did not
42 reveal any between-groups difference (all $F(6,93) \leq 2.39$, $p > 0.05$).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.3 Effects of intra-PAG DOI injected pre-Trial 1 and pre-Trial 2.

Figure 3 shows the effects of intra-PAG infusion of DOI (2 and 8 nmol/0.1 μ l) pre-Trial 1 and pre-Trial 2 upon behavior of mice exposed to the elevated plus-maze. Two-way ANOVA revealed significant effect for trial factor and treatment x trial interaction for both %OE (treatment factor: $F(6,92)=1.63$, $p>0.05$; trial factor: $F(1,92)=29.45$, $p<0.05$; treatment x trial interaction: $F(6,92)=3.32$, $p<0.05$) and %OT (treatment factor: $F(6,92)=2.69$, $p<0.05$; trial factor: $F(1,92)=49.63$, $p<0.05$; treatment x trial interaction: $F(6,92)=4.25$, $p<0.05$). Furthermore, ANOVA did not reveal any significant effects for closed arm entries (treatment factor: $F(6,92)=2.10$, $p>0.05$; trial factor: $F(1,92)=0.01$, $p>0.05$; treatment x trial interaction: $F(6,92)=1.45$, $p>0.05$). Post hoc Duncan test revealed a general decrease in open arms exploration on Trial 2 ($p<0.05$). Importantly, a reduction in open arms exploration for the group vehicle-vehicle on Trial 2 versus Trial 1 was confirmed by the paired Student's t test [%OE: $t(18) = 6.92$, $p<0.05$; %OT: $t(18) = 3.27$, $p<0.05$]. However, increases in the %OE and %OT were observed for the group DOI-DOI 8 nmol compared to other groups ($p<0.05$), except vehicle-DOI 8 nmol. A more detailed analysis for %OE measure with a single factor ANOVA did not show any between-groups differences on Trial 1 ($F(6,92)=1.55$, $p>0.05$), while a significant effect was detected on Trial 2 ($F(6,92)=2.48$, $p<0.05$). Indeed, post hoc analysis confirmed an increase of open arms exploration for the group DOI-DOI 8 nmol compared to other groups ($p<0.05$), except vehicle-DOI 8 nmol. One-way ANOVA for %OT showed differences for between-groups comparisons on both Trial 1 and Trial 2 ($F(6,92)=3.34$, $p>0.05$ and $F(6,92)=2.85$, $p<0.05$, respectively). Post hoc comparisons revealed a decrease in the % OT for the group DOI-DOI 2 nmol on Trial 1 compared to others ($p<0.05$), while an increase in open arm exploration was observed for the group DOI-DOI 8 nmol on Trial 2 compared to others ($p<0.05$), except vehicle-DOI 8 nmol ($p>0.05$).

3.4 Effects of MK-212 intra-PAG pre-Trial 1 and pre-Trial 2.

Figure 4 shows the effects of intra-PAG infusion of MK-212 (21.2 and 63.6 nmol/0.1 μ l) pre-Trial 1 and pre-Trial 2 upon behavior of mice exposed to the elevated

1
2
3 plus-maze. While two-way ANOVA revealed significant effects for trial factor and
4 treatment factor for both %OE (treatment factor: $F(6,73)=2.41$, $p<0.05$; trial factor:
5 $F(1,73)=19.54$, $p<0.05$) and %OT (treatment factor: $F(6,73)=3.95$, $p<0.05$; trial factor:
6 $F(1,73)=30.4$, $p<0.05$), a significant treatment x trial interaction was only shown for
7 percentage of open arm entries (%OE: $F(6,73)=2.25$, $p<0.05$; %OT: $F(6,73)=1.18$,
8 $p>0.05$). A reduction in open arms exploration for the group vehicle-vehicle on Trial 2
9 versus Trial 1 was confirmed by the paired Student's *t* test for % OT [$t(14) = 2.87$,
10 $p<0.05$], but not for % OE [$t(14) = 0.18$, $p>0.05$]. ANOVA also revealed a significant
11 trial effect for closed arm entries, but a no significant treatment or treatment x trial
12 interaction (treatment factor: $F(6,73)=0.98$, $p>0.05$; trial factor: $F(1,73)=8.99$, $p<0.05$;
13 treatment x trial interaction: $F(6,73)=0.22$, $p>0.05$). Post hoc Duncan test revealed a
14 general decrease in closed arms entries ($p<0.05$). However, a detailed analysis with single
15 factor ANOVA did not confirm between-groups differences neither on Trial 1 (F
16 $(6,73)=1.93$, $p>0.05$) nor on Trial 2 ($F(6,73)=0.93$, $p>0.05$). The same analysis applied to
17 %OE did not show any between-groups differences on Trial 1 ($F(6,73)=1.45$, $p>0.05$),
18 while a significant effect was detected for Trial 2 ($F(6,72)=2.69$, $p<0.05$). Post hoc
19 analysis showed an increase in %OE for the MK-MK 63.6 nmol group compared to
20 others ($p<0.05$), except vehicle-vehicle and vehicle/MK 63.6 nmol groups. Regarding to
21 %OT, a single factor ANOVA confirmed differences in between-groups on Trial 1
22 ($F(6,73)=3.57$, $p<0.05$) and a near effect on Trial 2 ($F(6,73)=1.92$, $p=0.08$). Post hoc
23 Duncan test performed on Trial 1 showed an increase in %OT for the group vehicle-MK
24 63.6 nmol compared to nearly all others ($p<0.05$), except MK-vehicle 63.6 nmol and
25 MK-MK 63.6 nmol ($p>0.05$). Besides, the same post hoc test also confirmed an increased
26 open arms exploration for the group MK-MK 63.6 nmol compared to other groups
27 ($p<0.05$), except vehicle-MK 63.6 nmol ($p>0.05$). Despite not being significant, the trend
28 observed on the intra-Trial 2 one-way ANOVA for % OT led us to perform a post hoc
29 Duncan test. The analysis revealed an augmented percentage of open arms time for the
30 group MK-MK 63.6 nmol versus all the other groups ($p<0.05$), except vehicle-MK 63.6
31 nmol and MK 63.6 nmol-vehicle groups ($p>0.05$).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4. Discussion

The present study demonstrated that microinfusions of DOI (a preferential 5-HT_{2A/2C} agonist) and MK-212 (a selective 5-HT_{2C} agonist), but not 8-OH-DPAT (a selective 5-HT_{1A} agonist) into the dorsal portion of the midbrain periaqueductal gray matter attenuate anxiety-like behaviours in mice previously exposed to the elevated plus-maze. Interestingly, this effect was predominantly observed in animals that also received intra-dPAG infusions of DOI or MK-212 on Trial 1.

The general analysis of the behavioural profile of mice in the EPM indicated an enhancement of anxiety indices in vehicle-treated maze-experienced mice, a result that corroborates previous findings showing that rodents explore less the open arms of EPM on subsequent maze exposures (Bertoglio and Carobrez, 2000; Bertoglio and Carobrez, 2003; Carobrez and Bertoglio, 2005; Holmes and Rodgers, 1998; Rodgers et al. 1996; File et al. 1993; File and Zangrossi, 1993). Importantly, this anxiogenic-like profile was observed in the absence of any significant change in closed arm entries, the parameter considered to be a valid index of locomotor activity in the plus-maze (e.g., Rodgers and Johnson, 1995). In fact, only vehicle-treated mice of the MK-212 experiment showed lower closed arm entries in Trial 2.

The lack of effect of 8-OH-DPAT on anxiety measures contrasts with previous studies showing an anti-aversive action of this 5-HT_{1A} receptor agonist in the EPM and other animal models of fear/anxiety (for a review see Menard and Treit, 1999; Graeff, 2004). Presently, we do not have a clear explanation for the 8-OH-DPAT failure on anxiety measures in the mouse EPM. However, it is important to emphasize that the anti-aversive effects of 5-HT_{1A} receptor agonists vary according to several factors such as animal model employed, injection target, range of doses and animal species used as well as previous apparatus experience (for reviews, see Graeff, 2004; Menard and Treit, 1999; Engin and Treit, 2008). As such, a recent study conducted by Broiz and co-workers (2007) demonstrated an anti-aversive effect of 8-OH-DPAT microinjected into the dPAG of rats that received electrical stimulation at the same site. However, when given to animals that had been previously exposed to an aversive experience (e.g., contextual fear conditioning) the compound failed to attenuate aversion. This finding, coupled with

1
2
3 contradictory effects obtained in the investigation of the role of 5-HT_{1A} receptors in
4 different brain structures using the EPM anxiety-like model (File et al. 1996; File and
5 Gonzalez, 1996; Gonzalez et al. 1996; Belcheva, 1994; Zangrossi and Graeff, 1994;
6 Gonzalez et al. 1996; Menard and Treit, 1998) seem to give support to the lack of effects
7 obtained in the present study. Although the present results do not exclude a potential role
8 of 5-HT_{1A} receptors in the neurobiology of sensitization of fear/anxiety in maze-
9 experienced animals, they suggest these receptors do not play an important role within
10 the PAG on the emotional state induced by both EPM exposure and reexposure in mice.

11
12
13
14
15
16
17 The anxiolytic-like effects obtained in the present study with the preferential 5-
18 HT_{2A} receptor agonist DOI are consistent with several reports from literature concerning
19 different animal models of fear/anxiety (for a review see Graeff, 2004; Menard and Treit,
20 1999; Engin and Treit, 2008). The properties of this compound upon the behaviour of
21 mice exposed to the EPM and other animal models involving test-retest protocol were
22 extensively investigated by the group headed by Michel Bourin (e.g., Dhonnchadha et al.
23 2003a, 2003b; Ripoll et al. 2006; Massé et al. 2007). Considering that the loss of a well
24 known anxiolytic-like effect of drugs in test-experienced rodents (OTT phenomenon) is
25 not exclusive for EPM test (e.g., Ripoll et al. 2005, 2006; Hascöet et al. 1997), our results
26 indicate that the 5-HT_{2A} receptors located within the dPAG play an important role in the
27 modulation of this phenomenon.
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 The exact mechanism through which DOI exerts its anxiolytic-like effects remains
38 unclear. However, previous findings seem to support that antiaversive-like effects
39 produced by 5-HT_{2A} receptor agonists can be either mediated by a facilitation in the
40 serotonergic (for a review see Deakin and Graeff, 1991; Graeff, 2004) or GABAergic
41 (Massé et al. 2007a, 2007b) neurotransmission in the PAG. The latter is supported by
42 studies demonstrating a co-localization of GABA and 5-HT_{2A} receptors within the PAG
43 (Griffiths and Lovick, 2002) and a facilitation of gabaergic neurotransmission after 5-
44 HT_{2A} pre-synaptic receptors activation (for a review, see Millan, 2003; Castilho et al.
45 2002; Cozzi and Nichols, 1996). Even though the anxiolytic-like effects of DOI may be a
46 consequence of its direct action in serotonergic neurons, the hypothesis concerning a
47 facilitation in the gabaergic neurotransmission find support in the results reported by
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Massé et al. (2006), in which serotonin depletion provoked by pCPA administration did
4 not modify the anxiolytic-like effect of the 5-HT_{2A} receptor agonist in the four-plate test.
5

6 Considering the occurrence of functional status changes of 5-HT_{2A} receptors as
7 well as a reduction in the 5-HT_{2A} mRNA and protein expression in the brain of rats
8 exposed to acute stress (Chaouloff et al. 1994; Izumi et al. 2002; Vaidya et al. 1999; Wu
9 et al. 1999) it can be raised that a previous EPM experience could lead to a decrement in
10 the spontaneous activity of 5-HT_{2A} receptors and a consequent reduction in the gabaergic
11 transmission. Evidence showing that a 5 minutes single exposure to the plus-maze results
12 in a marked increase in plasmatic corticosterone levels (File et al. 1994, Rodgers et al.
13 1999, Albrechet-Souza et al. 2007) seems to support this assumption. If so, such changes
14 would result in an increment in the anxiety that is prevented by DOI administration. This
15 hypothesis is supported by the results obtained in the present study with DOI, since this
16 5-HT_{2A} receptor agonist was ineffective on anxiety measures upon first EPM experience.
17
18

19 Importantly, in the present study the anxiolytic-like effect of DOI was observed
20 with the highest dose tested (8 nmol) in maze-experienced mice that received the same
21 intra-dPAG treatment on Trial 1 (DOI-DOI group). It is possible that the previous
22 administration of DOI influenced the association between the maze cues and the
23 corresponding aversive emotional response in such a way that the drug experience may
24 have reduced the aversive reaction related to the first exposure to the apparatus,
25 attenuating an association between the maze context and the anxiety state. This finding
26 corroborates previous results demonstrating that the influence of prior experience with
27 the plus-maze on the anxiolytic action of a drug during Trial 2 seems to depend critically
28 on the drug state in which Trial 1 is experienced (Escarabajal et al., 2003). In this context,
29 File et al. (1990) observed that an injection of a high dose of chlordiazepoxide (75
30 mg/kg) on Trial 1 prevented the lack of anxiolytic action of this drug (7.5 mg/kg) during
31 EPM re-exposure, even though this pharmacological procedure probably affected the
32 one-Trial tolerance effect due to the sedative or amnesic effect of the injected high dose
33 of chlordiazepoxide.
34
35

36 Another important finding in this study is the anxiolytic-like effect produced by
37 intra-PAG microinfusions of MK-212 (63.6 nmol) in maze-naïve and maze-experienced
38 mice. Although somewhat less markedly, the anxiolytic-like profile demonstrated on
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Trial 1 (e.g., increased %OT) is in accordance with previous findings from our group that
4 demonstrated an anxiolytic-like effect of intra-PAG infusions of mCPP, a 5HT_{2B/2C}
5 receptor agonist, in mice exposed to the EPM (Nunes-de-Souza et al. 2008), an effect
6 completely blocked by intra-PAG pretreatment with ketanserin, a preferential 5HT_{2A/2C}
7 receptor antagonist. Moreover, the current study accounts for the consequences of
8 previous maze experience and indeed shows anxiolytic effects for the highest dose of
9 MK-212 on Trial 2 on the conventional measures of open arm avoidance. Importantly,
10 while on Trial 1 both MK-MK 63.6 nmol group and vehicle-MK 63.6 nmol group
11 increased percentage of open entries and percentage of open time in comparison to
12 control (vehicle-vehicle), on the Trial 2 this anxiolytic-like pattern seems to be more
13 specific to the group MK-MK 63.6 nmol regarding the percentage of open arms time.
14 Although statistically significant, the unexpected “anxiolytic-like” effect observed in the
15 group vehicle-MK 63.6 nmol does not seem to be consistent, since both vehicle-vehicle
16 and the vehicle-MK groups received the same intra-PAG vehicle infusion in the first
17 EPM Trial.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29
30 Altogether, these results suggest that, in the same direction as the experiment with
31 DOI, not only is the maze-experience crucial to study drug effects on Trial 2, but also the
32 drug state on Trial 1. Additionally, these findings strongly support an important role of
33 the 5-HT_{2C} receptors located within the mouse PAG on the emotional state induced by
34 EPM test and retest paradigm.
35
36
37
38
39
40
41

42 **5. Conclusions**

43
44
45 The present study demonstrated that microinfusions of DOI (a preferential 5-
46 HT_{2A/2C} agonist) and MK-212 (a selective 5-HT_{2C} agonist), but not 8-OH-DPAT (a
47 selective 5-HT_{1A} agonist) into the dorsal portion of the midbrain periaqueductal gray
48 matter attenuate anxiety-like behaviours in mice previously exposed to the elevated plus-
49 maze, an effect that was predominantly observed in animals that also received intra-
50 dPAG infusions of DOI or MK-212 on Trial 1. These findings support a role of the 5-
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5-HT_{1A}) receptors located within the mouse PAG on the
4 emotional state induced by EPM test and retest paradigm.
5
6

7 8 **Acknowledgements** 9

10
11 This study was supported by FAPESP (Proc. 02/03705-0), CNPq and PADC/FCF-
12 UNESP. K.S. Gomes was recipient of FAPESP (Proc. 04/14490-0), and R.L. Nunes-de-
13 Souza received a CNPq research fellowship (309407/2006-0).
14
15
16
17

18 19 **References** 20 21

22 Albrechet-Souza L, Borelli GK, Brandão ML. Activity of the medial prefrontal cortex
23 and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *J*
24 *Neurosci Meth* 2008; 169:109-18.
25
26

27
28
29 Albrechet-Souza L, Carvalho MC, Franci CR, Brandao ML. Increases in plasma
30 corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to
31 the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Horm*
32 *Behav* 2007; 52: 267-73.
33
34
35
36

37
38 Alves SH, Pinheiro G, Motta V, Landeira-Fernandes J, Cruz APM. Anxiogenic
39 effects in the rat elevated plus-maze of 5HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal
40 hippocampus. *Behav Pharmacol* 2004; 15:37–43.
41
42
43
44

45 Barbalho CA, Canto-de-Souza AL, Nunes-de-Souza RL. Similar anxiolytic-like
46 effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and
47 antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist
48 in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain Res* 2009; 1267: 65-76.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Beitz AJ, Clements JR, Mullet M, Ecklund L. Differential origin of brainstem
4 serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus
5 of the rat. *J Comp Neurol* 1986; 250:498–9.
6
7

8
9
10 Belcheva I, Belcheva S, Petkov VV, Petkov VD. Hippocampal asymmetry in the
11 behavioural responses to the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Brain Res* 1994;
12 640:223–8.
13
14

15
16
17 Bertoglio JL, Carobrez AP. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor
18 ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats.
19 *Psychopharmacology* 2003; 170:335-42.
20
21

22
23
24 Bertoglio JL, Carobrez AP. Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial
25 tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. *Behav Pharmacol* 2004;
26 15(1):45-54.
27
28

29
30
31 Bertoglio JL, Anzini C, Lino-de-Oliveira C, Carobrez AP. Enhanced dorsolateral
32 periaqueductal gray activity counteract the anxiolytic response to midazolam on the
33 elevated plus-maze trial 2 in rats. *Behav Brain Res* 2005; 162:99-107.
34
35
36

37
38 Bertoglio JL, Carobrez AP. Previous maze experience required to increase open
39 arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav*
40 *Brain Res* 2000; 108:197-203.
41
42
43

44
45 Bertoglio JL, Carobrez AP. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are
46 abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol*
47 *Biochem Behav* 2002a; 73:963–9.
48
49

50
51
52 Bertoglio JL, Carobrez AP. Prior maze experience required to alter midazolam effects
53 in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2002b; 72:
54 449-55.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 Brandão ML, Lopez-Garcia JA, Roberts MHT. Electrophysiological evidence for
5 excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurones of the rat midbrain
6 tectum. *Brain Res* 1991; 66:259–66.
7
8
9

10
11 Broiz ACG, Oliveira LC, Brandão ML. Regulation of conditioned and unconditioned
12 fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol*
13 *Biochem Behav* 2008; 89:76-84.
14
15
16
17

18
19 Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza RL, Rodgers RJ. Anxiolytic-like effect of WAY-
20 100635 microinfusions into median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to
21 the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res* 2002; 928: 50-9.
22
23
24

25
26 Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like
27 behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;
28 29(8):1193-205.
29
30
31

32
33 Castilho VM, Macedo CE, Brandão ML. Role of benzodiazepine and serotonergic
34 mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation
35 of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats.
36 *Psychopharmacology* 2002; 165:77–85.
37
38
39
40

41
42 Chaouloff F, Baudrie V, Coupry I. Effects of chlorisondamine and restraint on
43 cortical [3H]ketanserin binding, 5-HT_{2A} receptor mediated head shakes, and
44 behaviours in models of anxiety. *Neuropharmacol* 1994; 33:449–56.
45
46
47
48

49
50 Clements JR, Beitz AJ, Fletcher TF, Mullett MA. Immunocytochemical localization
51 of serotonin in the rat periaqueductal grey: a quantitative light and electron
52 microscope study. *J Comp Neurol* 1985; 236:60–70.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Cornélio AM, Nunes-de-Souza RL. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions
4 into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to
5 elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 2007; 178:82–90.
6
7
8

9
10 Cozzi NV, Nichols DE. 5-HT_{2A} receptor antagonists inhibit potassium-stimulated
11 gamma-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1996;
12 309:25–31.
13
14
15

16
17 Cruz APM, Pinheiro G, Alves SH, Ferreira G, Mendes M, Faria L, Macedo CE,
18 Motta V, Landeira-Fernandez J. Behavioral effects of systemically administered MK-
19 212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats
20 exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 2005; 182:345–54.
21
22
23
24

25
26 Dal-Cól MLC, Pereira LO, Rosa VP, Calixto AV, Carobrez AP, Faria MS. Lack of
27 midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze trial 2 is dependent on the length of
28 trial 1. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74:395-400.
29
30
31

32
33 Dawson GR, Crawford SP, Stanhope KJ, Iversen SD, Tricklebank MD. One-trial
34 tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to
35 locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology* 1994;
36 113:570-2.
37
38
39
40

41
42 Deakin JFW, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol*
43 1991; 5(4):305-15.
44
45
46

47
48 Dhonnchadha BAN, Bourin M, Hascöet M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands
49 on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res* 2003a; 140:203–14.
50
51

52
53 Dhonnchadha BAN, Hascöet M, Jolliet P, Bourin M. Evidence for a 5-HT_{2A} receptor
54 mode of action in the anxiolytic-like properties of DOI in mice. *Behav Brain Res*
55 2003b; 147:175–84.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Duxon MS, Beckett SR, Baxter GS, Blackburn TP, Fone KCF. Intraamygdala
6 injection of the 5-HT_{2B} receptor agonist BW-72386 produces anxiolysis on the
7 elevated plus-maze in the rat. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 331–331.
8
9

10
11 Engin E, Treit D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals'
12 unconditioned fear reactions: A systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol*
13 *Psychiatry* 2008; 32(6):1399-419.
14
15

16
17 Escarabajal MD, Torres C, Flaherty CF. The phenomenon of one-trial tolerance to the
18 anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by
19 previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sci* 2003; 73(8): 1063-
20 74.
21
22

23
24 Fachini G, Reis LM, Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza AL. Microinfusions of 8-
25 OH-DPAT into the ventral hippocampus produce anxiety in the elevated plus-maze in
26 mice. In: Abstracts of the International Behavioral Neuroscience Society, Key West
27 2004; (73):49.
28
29
30

31
32
33 File SE, Mabutt PS, Hitchcott PK. Characterization of the phenomenon of “one-trial
34 tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze.
35 *Psychopharmacology* 1990; 102:98-101.
36
37
38

39
40 File SE, Zangrossi HJr. “One-trial tolerance” to the anxiolytic actions of
41 benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?
42 *Psychopharmacology* 1993; 110:240-4.
43
44
45

46
47 File SE, Zangrossi HJr, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a
48 different form of fear? *Psychopharmacology* 1993; 111:491-4.
49
50

51
52 File SE, Gonzalez LE, Andrews N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-
53 HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci*
54 1996; 16:4810–5.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 File SE, Gonzalez LE. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor
6 ligands in dorsal raphé and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;
7 54(1):123-8.
8
9

10
11 File SE, Gonzalez LE, Gallant R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in
12 the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19:397–405.
13
14
15

16
17 File SE, Gonzalez LE, Gallant, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in
18 mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of
19 anxiety. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21:312–20.
20
21
22

23
24 File SE, Zangrossi H, Sanders FL ,Mabbutt PS. Raised corticosterone in the rat after
25 exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 1994; 113: 543–546.
26
27
28

29
30 Fornal CA, Metzler CW, Gallegos RA, Veasey SC, McCreary AC, Jacobs BL. WAY-
31 100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases
32 serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *J*
33 *Pharmacol Exp Ther* 1996; 27:752–62.
34
35
36

37
38 Gonzalez LE, Adrews N, File SE. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the
39 basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the
40 elevated plus-maze. *Brain Res* 1996; 732(1-2):145-53.
41
42
43
44

45
46 Gonzalez LE, File SE. A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the
47 state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* 1997;
48 17:1505-11.
49
50

51
52 Graeff FG, Guimarães FS, Andrade TGCS, Deakin JFW. Role of 5-HT in stress,
53 anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54(1):129–41.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci*
4 *Biobehav Rev* 1997; 21(6):791–9.

5
6
7
8 Graeff FG. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology* 2002; 163:
9 467-76.

10
11
12
13 Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*
14 2004; 28:239-59.

15
16
17
18 Griffiths JL, Lovick TA. Co-localization of 5-HT_{2A}-receptor- and
19 GABA immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat.
20 *Neurosci Lett* 2002; 326:151–4.

21
22
23
24
25
26 Hajós M, Hoffmann WE, Tetko IV, Hyland B, Sharp T, Villa AEP. Different tonic
27 regulation of neuronal activity in the rat dorsal raphe and medial prefrontal cortex via
28 5HT_{1A} receptors. *Neurosci Lett* 2001; 304:129–32.

29
30
31
32
33 Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonist in a maze-exploration
34 model of “fear-motivated behaviour”. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol* 1984;
35 327:1-5.

36
37
38
39
40 Hascöet M, Bourin M, Couetoux du Tertre A. Influence of prior experience on mice
41 behavior using the four-plate test. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58:1131–8.

42
43
44
45 Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze
46 experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol*
47 *Biochem Behav* 1998; 60:473-88.

48
49
50
51
52 Holmes A, Iles JP, Mayell SJ, Rodgers RJ. Prior test experience compromises the
53 anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test.
54 *Behav Brain Res* 2001; 122:159–67.

1
2
3
4
5 Izumi T, Suzuki K, Inoue T, Li XB, Maki Y, Muraki I. Longlasting change in 5-
6 HT2A receptor-mediated behavior in rats after a single footshock. *Eur J Pharmacol*
7 2002; 452:199–204.
8
9

10
11
12 Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.
13 *Psychopharmacology* 1987; 92:180-5.
14
15

16
17 Lovick TA. Serotonergic influence from nucleus raphe obscurus on neurones in the
18 periaqueductal grey matter in the rat. *Brain Res* 1993; 606:92–8.
19
20

21
22 Lovick TA. Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to
23 aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on
24 identified output neurons. *Neurosci* 2000; 95:763–72.
25
26
27

28
29 Massé F, Dhonnchadha BAN, Hascöet M, Bourin M. Anxiolytic-like effect of 5-HT2
30 ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of
31 anxiety (the four-plate test and the elevated plus-maze). *Behav Brain Res* 2007a;
32 177:214-26.
33
34
35
36

37
38 Massé F, Hascöet M, Bourin M. Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like
39 activity of DOI (a 5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test. *Eur*
40 *Neuropsychopharmacology* 2007b; 17:483-91.
41
42
43
44

45
46 Massé F, Hascöet M, Dailly E, Bourin M. Effect of noradrenergic system on the
47 anxiolytic-like effect of DOI (5-HT_{2A/2C} agonist) in the four-plate test.
48 *Psychopharmacology* 2006; 183:471-81.
49
50

51
52
53 McGregor IS, Dielenberg RA. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on
54 first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology* 1999;
55 147:174–81.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Menard J, Treit D. The septum and the hippocampus differentially mediate the
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Menard J, Treit D. The septum and the hippocampus differentially mediate the
anxiolytic effects of R(1)-8-OH-DPAT. *Behav Pharmacol* 1998; 9(2):93-101.

Menard J, Treit J. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal
models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23:591-613.

Messier C, Émond S, Ethier K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia
in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 63(2):313-8.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003;
70:83–244.

Moreira CM, Masson S, Carvalho MC, Brandao ML. Exploratory behaviour of rats in
the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and
central amygdaloid nuclei. *Brain Res Bull* 2007; 71:466-74.

Munday MK, Fletcher A, Marsden CA. Effects of 8-OHDPAT and 5-HT1A
antagonists WAY100135 and WAY100635, on guinea-pig behaviour and dorsal
raphe 5-HT neurone firing. *Br J Pharmacol* 1996; 117:750–6.

Nogueira RL, Graeff FG. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of
aversion generated in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*
1995; 52:1-6.

Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Da-Costa M, Fornari RV, Pelá IR, Graeff
FG. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala
administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology* 2000; 150:300–
10.

1
2
3 Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Rodgers RJ. Effects of intra-hippocampal
4 infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice: Influence of site of
5 injection and prior test experience. *Brain Res* 2002; 927:87-96.
6
7

8
9
10 Nunes-de-Souza V, Nunes-de-Souza RL, Rodgers R J, Canto-de-Souza A. 5-HT2
11 receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like
12 behaviour in mice. *Behav Brain Res* 2008; 187:72-9.
13
14
15

16
17 Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. California:
18 Elsevier Science, 2001.
19
20

21
22 Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an
23 elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;
24 14:149–67.
25
26
27

28
29 Pereira JK, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro RA, Frussa-Filho R. The phenomenon of
30 “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-
31 maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci*
32 1999; 65(10):101–7.
33
34
35
36

37
38 Pierce PA, Peroutka SJ. Hallucinogenic drug interactions with neurotransmitter
39 receptor binding sites in human cortex. *Psychopharmacology* 1989; 97:118–22.
40
41
42

43
44 Porter RH, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF. Functional
45 characterization of agonists at recombinant human 5-HT2A, 5-HT2B and 5-HT2C
46 receptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 1999; 128:13–20.
47
48
49

50
51 Ripoll N, Dhonnchadha BAN, Sebille V, Bourin M, Hascöet M. The four-plates test-
52 retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. *Psychopharmacology* 2005; 180:73–
53 83.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Ripoll N, Hascöet M, Bourin M. Implication of 5-HT_{2A} subtype receptors in DOI
4 activity in the four-plates test-retest paradigm in mice. *Behav Brain Res* 2006;
5 166:131-9.
6
7
8

9
10 Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological
11 measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem*
12 *Behav* 1995; 52:297–303.
13
14
15

16
17 Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone
18 response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice.
19 *Physiol Behav* 1999; 68: 47–53.
20
21
22

23
24 Rodgers RJ, Johnson JC, Dewar CV, Kidd GR, Kimpson PH. Plus-maze retest profile
25 in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic
26 receptor blockade. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54(1):41-50.
27
28
29

30
31 Shekhar A. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats
32 regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res*
33 1993; 627(1): 9-16.
34
35
36

37
38 Titeler M, Lyon RA, Glennon RA. Radioligand binding evidence implicates the brain
39 5-HT₂ receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens.
40 *Psychopharmacology* 1988; 94:213–6.
41
42
43

44
45 Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze.
46 *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 44:463–9.
47
48
49

50
51 Vaidya VA, Terwilliger RM, Duman RS. Role of 5-HT_{2A} receptors in the stress-
52 induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat
53 hippocampus. *Neurosci Lett* 1999; 262:1–4.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM. Projections of the median raphe nucleus in the rat.
4
5 J Comp Neurol 1999; 407:555-82.
6

7
8 Wu J, Kramer GL, Kram M, Steciuk M, Crawford IL, Petty F. Serotonin and learned
9
10 helplessness: a regional study of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} receptors and the serotonin
11
12 transport site in rat brain. J Psychiatr Res 1999; 33:17–22.
13

14
15 Zangrossi HJr, Graeff FG. Behavioural effects of intra-amygdala injections of GABA
16
17 and 5-HT acting drugs in the elevated plusmaze. Braz J Med Biol Res 1994;
18
19 27:2453–6.
20

21
22 Zangrossi H Jr, Viana MB, Graeff FG. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection
23
24 of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze.
25
26 Eur J Pharmacol 1999; 369(3): 267-70.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legends

Figure 1. A schematic representation of microinfusion sites within (filled circles) the midbrain periaqueductal gray (PAG) of the mouse. The blank circles represent the sites of injection outside the main target (dPAG). The number of points in the figure is less than the total number of mice because of the overlaps.

Figure 2. Effects of 8-OH-DPAT (5.6 and 10.0 nmol/0.15 μ l) microinfusions into the periaqueductal gray on the frequency of enclosed arms entries (A), percentage of open arms entries (B) and percentage of open arms time (C) on Trial 1 and Trial 2 in the EPM. n= 11- 26. *p<0.05 versus veh-veh on Trial 1.

Figure 3. Effects of DOI (2.0 and 8.0 nmol/0.10 μ l) microinfusions into the periaqueductal gray on the frequency of enclosed arms entries (A), percentage of open arms entries (B) and percentage of open arms time (C) on Trial 1 and Trial 2 in the EPM. n= 11- 19. *p<0.05 versus veh-veh on Trial 1; #p<0.05 versus all other groups on Trial 2, except veh-DOI 8 nmol.

Figure 4. Effects of MK-212 (21.2 and 63.6 nmol/0.10 μ l) microinfusions into the periaqueductal gray on the frequency of enclosed arms entries (A), percentage of open arms entries (B) and percentage of open arms time (C) on Trial 1 and Trial 2 in the EPM. n= 8-15. *p<0.05 versus veh-veh on Trial 1; #p<0.05 versus all other groups on Trial 2, except veh-veh and veh-MK 63.6 nmol; +p<0.05 versus all other groups on Trial 1; §p<0.05 versus veh-veh on Trial 2.

Figure 1

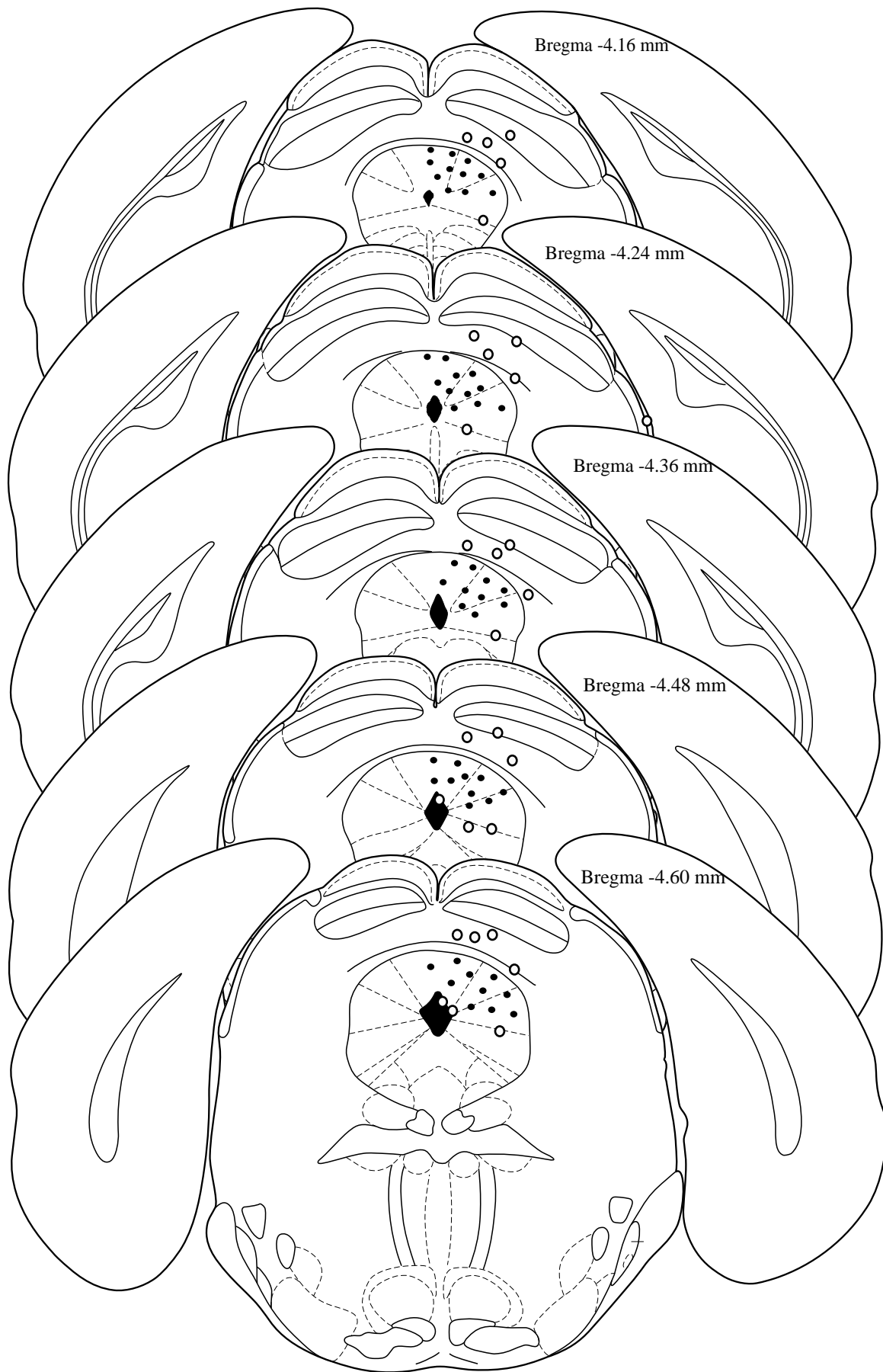


Figure 2

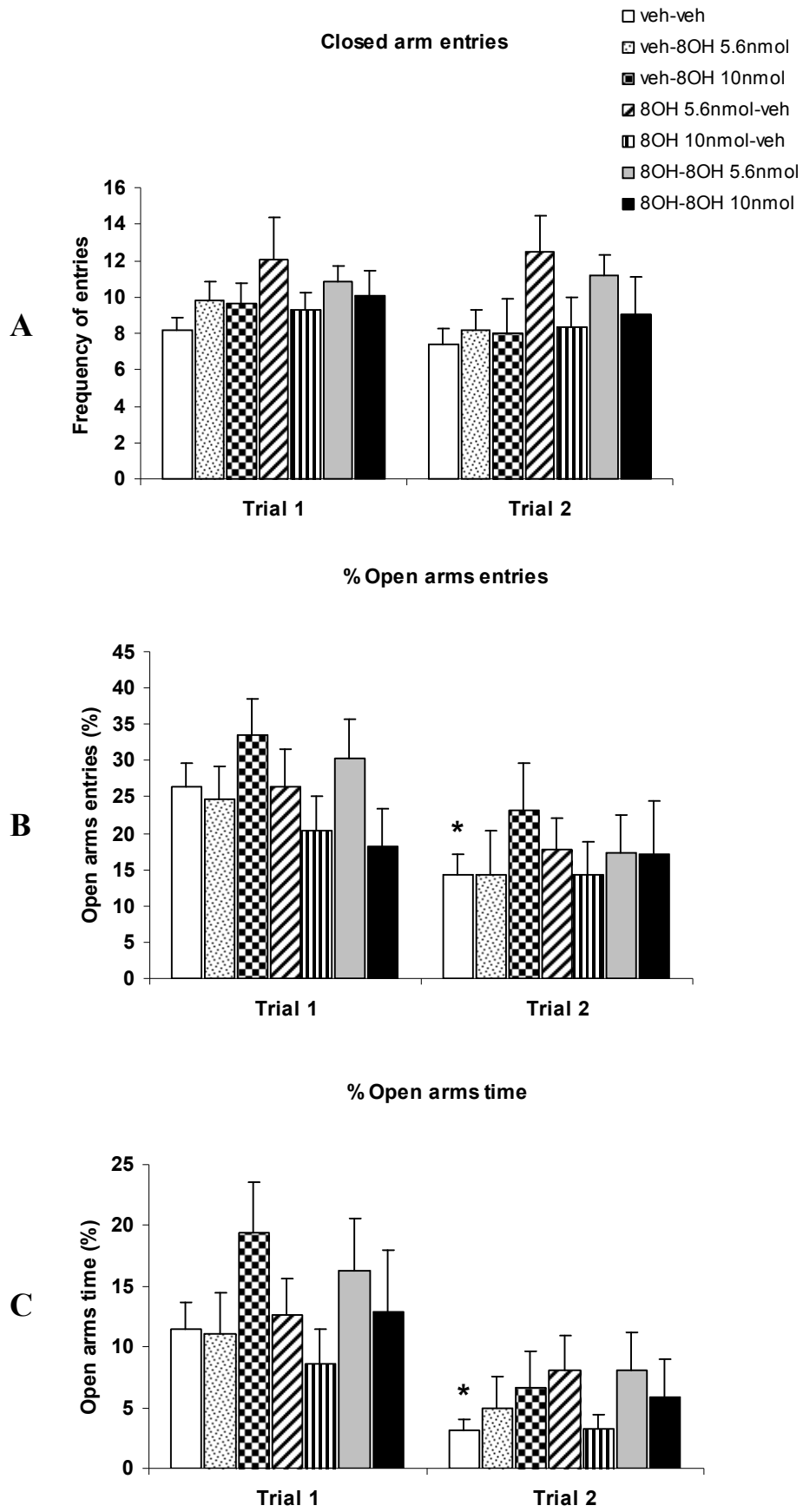


Figure 3

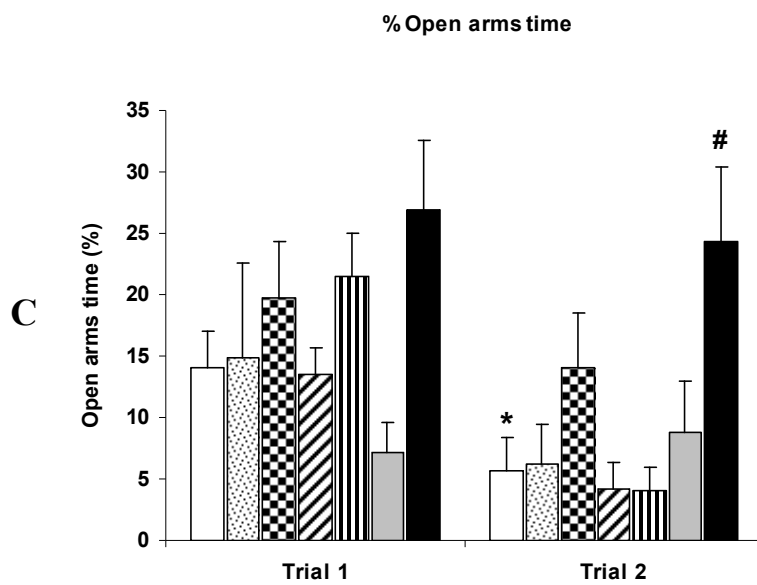
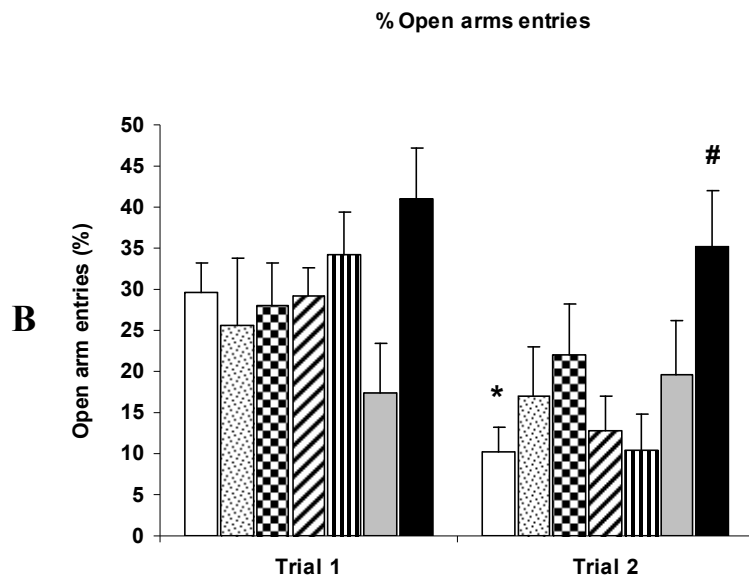
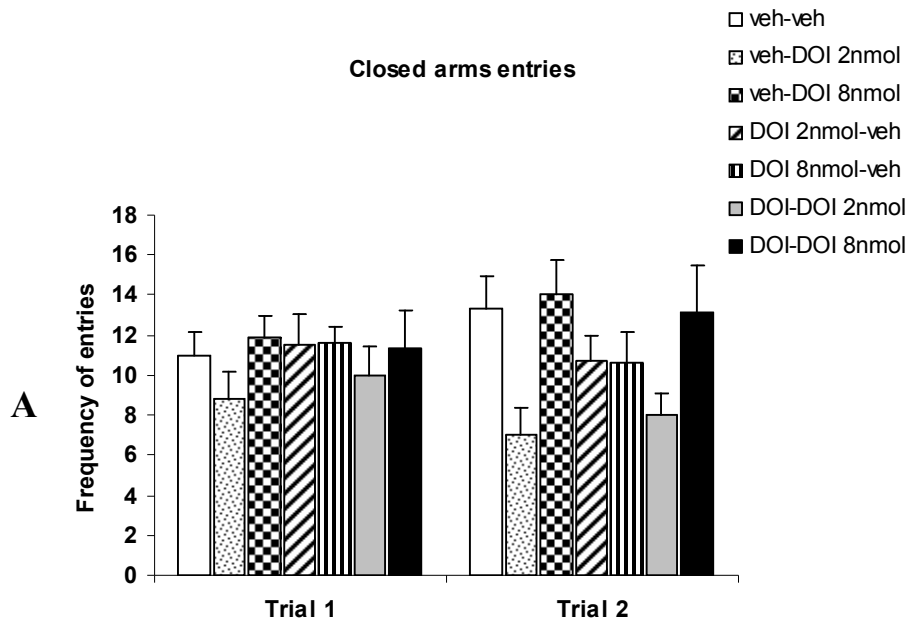
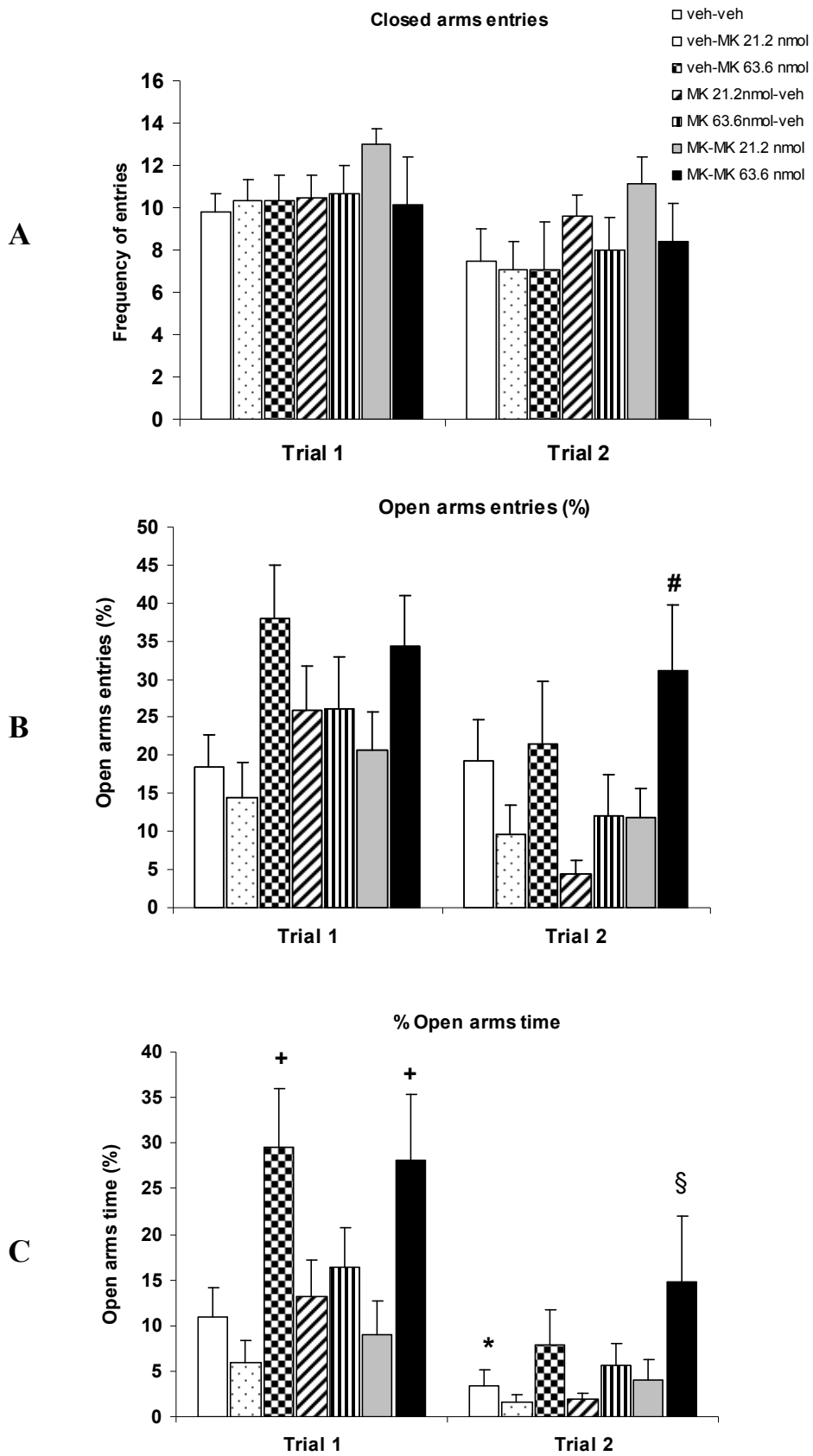


Figure 4



Ethics

The experiments carried out in this study are in compliance with the norms of Brazilian Neuroscience and Behavior Society (SBNeC), based on the US National Institutes of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals.

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](#)