UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Paloma Molina Hernandez

O papel dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo dorsal e ventral na
mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade

Ribeirão Preto
2020

Paloma Molina Hernandez

O papel dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo dorsal e ventral na
mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

**Ribeirão Preto
2020**

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

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

Hernandes, Paloma Molina

O papel dos receptores 5-Ht1A do hipocampo dorsal e ventral na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade. Ribeirão Preto, 2020.

LXVIII f.

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

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Hipocampo 2. Serotonina 3. Comportamentos defensivos 4. Ansiedade 5. Vogel

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paloma Molina Hernandez

O papel dos receptores 5-Ht1A do hipocampo dorsal e ventral na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade. Ribeirão Preto, 2020.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP - USP Assinatura: _____

Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan

Instituição: FMRP - USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: CCB - UFSC Assinatura: _____

Instituição: Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos e
Ândrea, pilares da minha formação como ser
humano. Obrigada por todo apoio e incentivo ao
longo dessa trajetória. Este trabalho também é de
você.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior pela oportunidade, apoio, confiança, ensinamentos e constante suporte na realização deste trabalho. Obrigada por ser um exemplo de pesquisador íntegro.

À Prof. Dra Telma Carneiro Spera de Andrade por todo apoio e incentivo durante essa caminhada e pela ajuda crucial no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite, pela prontidão e disponibilidade. Agradeço desde já pelas enriquecedoras sugestões e discussões.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia e também de outros departamentos, que de alguma forma contribuíram para este trabalho e também para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários da SPG, da FMRP e do Departamento de Farmacologia. Agradeço em especial aos amigos da secretaria: Gislaine Pedroso de Moraes Marques e José Waldick Ramon. Aos técnicos: Eleni Luiza Tamburus Gomes, Tadeu Franco Vieira, Diva Amábile Montanha de Souza, Marcos Antônio de Carvalho. Aos colegas do biotério: Eliana Beatriz Castrechini de Barros, Marco Antônio Ribeiro da Silva, Orlando Mesquita Júnior. Todos vocês fizeram este trabalho acontecer. Obrigada pela paciência e prontidão em sempre me ajudar no que fosse preciso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível realizar este trabalho.

Ao técnico e amigo Afonso Paulo Padovan, que fez o possível e o impossível para me ajudar durante esses anos. Obrigada pelas risadas, pelos ensinamentos, pelo bom dia respondido com tanto carinho e entusiasmo e por tornar meus dias mais leves.

À Ana Beatriz Sant'Ana do Nascimento, obrigada por me receber tão bem, por dividir seu conhecimento, sua experiência e por todo apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À todos os amigos do laboratório de Farmacologia do Comportamento, em especial à Alana Tercino Frias, à Heloisa Helena Vilela-Costa, ao Jhonatan Christian Maraschin, e ao Matheus Fitipaldi Batistela. Obrigado por se tornarem minha família, por todo apoio, incentivo, conselhos, risadas e por sempre se preocuparem comigo. Obrigada por aturarem minhas reclamações e sempre me ajudarem a evoluir. Vocês são meus pontos de apoio, foram essências para a realização deste trabalho e para a construção da pessoa que sou hoje. Amo muito todos vocês.

Aos amigos de fora do meio acadêmico: Matheus, Lia, Popi, Lorena, Livia, Marlon, Alana, Vitor e Mayara. Obrigada pela companhia, pelo incentivo, por serem válvulas de escape, por toda ajuda e todo amor dado a mim ao longo dessa caminhada. Vocês se tornaram minha família e eu agradeço demais ao universo por ter vocês. Amo vocês.

À todos da minha família, que sempre torceram, incentivaram e me ajudaram quando eu precisei. Em especial aos meus avós, meus tios Lilinho e André, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui e para que esse sonho fosse possível. Muito obrigada.

Às minhas irmãs: Natália, Maria e Letícia por terem tornado minha vida muito mais colorida e alegre. Por me ensinarem desde pequena a assumir responsabilidades e amar incondicionalmente. Agradeço por todas as vezes que entenderam minha ausência, por sempre me fazerem e se fazerem presente. Lela, obrigada por todas as vezes que me atendeu de madrugada, que escutou minhas

reclamações, que fez com que eu me sentisse em casa mesmo que a quilômetros de distância. Obrigada por ser sempre minha alegria.

Aos meus pais, Marcos e Ândrea, meus mais profundos agradecimentos. Como em toda jornada essa também teve seus altos e baixos, houve momentos onde tudo parecia difícil e frustrante demais, e durante todos esses momentos vocês estiveram ao meu lado me ensinando a ver o lado bom de todas as situações e comemorar cada pequena conquista. Obrigada por acreditarem em mim, por entenderem minha ausência e as horas loucas de trabalho, por serem meu porto seguro, meus exemplos de resiliência e caráter. Obrigada por todo amor, que sempre transbordou e me fez mais forte e corajosa. Mais que minha essa conquista é de vocês, pois tudo que sou e tudo que conquisto, é pra vocês e por vocês. Amo vocês ao infinito e além.

E finalmente, à Deus e todas as energias do universo por sempre cuidar dos meus caminhos, acalmar minha alma e colocar pessoas tão maravilhosas na minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

Resumo

Hernandes, Paloma Molina. **O papel dos receptores 5-HT1A do hipocampo dorsal e ventral na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade.** 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O hipocampo é uma estrutura bilateral que, em roedores, se estende do eixo dorsal ao ventral, podendo ser dividido em hipocampo dorsal (HD) e hipocampo ventral (HV). Apesar de ser conhecido principalmente por sua participação na formação de memória e na navegação espacial, o hipocampo ocupa também um papel fundamental na ansiedade. Sabe-se que a neurotransmissão serotoninérgica, principalmente a mediada por receptores 5-HT1A, desempenha um papel crítico na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade e que o aumento desta neurotransmissão no hipocampo é requerida para a eficácia de drogas utilizadas no tratamento dos transtornos de ansiedade, tais como a imipramina e a fluoxetina. A distribuição dos receptores 5-HT1A e sua ação no hipocampo é diferente ao longo do eixo dorsoventral. Mais especificamente, no HD, a ativação dos receptores 5-HT1A causa um efeito do tipo ansiogênico em testes comportamentais. Por outro lado, no HV, apesar de escassa a literatura, a ativação destes receptores parece ser ansiolítica. Portanto, o objetivo do presente estudo foi estender as investigações acerca da dualidade do efeito da ativação dos receptores 5-HT1A no HD e no HV do hipocampo e entender os efeitos ocasionados nestes receptores pelo tratamento crônico com antidepressivos. Inicialmente, avaliamos as consequências de injeções intra-HD e intra-HV de serotonina ou do agonista de 5-HT1A 8-OH-DPAT em ratos submetidos ao teste de beber punido de Vogel. Também no HV, foram analisados os efeitos decorrentes da injeção do antagonista de receptores 5-HT1A WAY-100635 e as consequências da combinação das injeções locais deste antagonista com a de serotonina e 8-OH-DPAT. Na segunda etapa, avaliamos se o tratamento crônico com a fluoxetina e a imipramina, altera a resposta modulada pela injeção intra-HD de 8-OH-DPAT. Os resultados mostram que a injeção dos agonistas intra-HD e intra-HV provocaram, respectivamente, respostas do tipo ansiogênica e ansiolítica no teste de beber punido de Vogel. A injeção de WAY100635 no HV provocou resposta do tipo ansiogênica e a dose subefetiva deste antagonista foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico da injeção de serotonina e de 8-OH-DPAT no HV. Por fim, foi possível observarmos que o tratamento crônico com imipramina ou fluoxetina foi capaz de diminuir o efeito ansiogênico causado pela administração de 8-OH-DPAT no HD. Estes resultados sugerem que os receptores 5-HT1A no HD e no HV desempenham papéis opostos no processamento da ansiedade, e que o tratamento crônico com antidepressivos diminui a resposta modulada por estes receptores no HD.

Palavras-chaves: Hipocampo. Serotonina. Comportamentos defensivos. Ansiedade. Vogel.

Abstract

Hernandes, Paloma Molina. **Involvement of 5-HT1A receptor of the dorsal and ventral hippocampus on anxiety-related defensive responses.** 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The hippocampus is a bilateral structure that, in rodents, extends from the dorsal to the ventral axis, and can be divided into dorsal hippocampus (DH) and ventral hippocampus (VH). Despite being known mainly for its participation in memory formation and spatial navigation, the hippocampus also plays a fundamental role in anxiety. It is known that serotonergic neurotransmission, mainly mediated by 5-HT1A receptors, plays a critical role in modulating anxiety-related behaviors and that the increase in this neurotransmission in the hippocampus is required for the effectiveness of drugs used to treat anxiety disorder, such as imipramine and fluoxetine. The distribution of 5-HT1A receptors and their action in the hippocampus is different along the dorsoventral axis. More specifically, in DH, the activation of 5-HT1A receptors causes an anxiogenic like effect in behavioral tests. On the other hand, in VH, despite the scarce literature, the activation of these receptors seems to be anxiolytic. Therefore, the aim of the present study was to extend the investigations about the dual effect of the activation of 5-HT1A receptors in the DH and VH and to understand the effects caused in these receptors by chronic treatment with antidepressants. Initially, we measured the consequences of intra-DH and intra-VH injections of serotonin or the 5-HT1A 8-OH-DPAT agonist in rats subjected to the Vogel punished test. Also in VH, we analyzed the effects resulting from the injection of the 5-HT1A receptor antagonist WAY-100635 and the consequences of combining local injections of this antagonist with serotonin and 8-OH-DPAT. In the second step, we evaluated whether chronic treatment with fluoxetine and imipramine alters the response modulated by the intra-DH injection of 8-OH-DPAT. The results show that the injection of intra-DH and intra-VH agonists provoked, respectively, anxiogenic and anxiolytic responses in the Vogel punished test. The injection of WAY-100635 in VH caused an anxiogenic response and the subeffective dose of this antagonist was able to block the anxiolytic effect of the injection of serotonin and 8-OH-DPAT in VH. Finally, it was possible to observe that chronic treatment with imipramine or fluoxetine was able to decrease the anxiogenic effect caused by the administration of 8-OH-DPAT in DH. These results suggest that 5-HT1A receptors in DH and VH play opposite roles in the processing of anxiety, and that chronic treatment with antidepressants decreases the response modulated by these receptors in HD.

Keywords: Hippocampus. Serotonin. Defensive behaviors. Anxiety. Vogel.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Comportamentos defensivos e a ansiedade	13
1.2 Sistemas neurais subjacentes aos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade	16
1.3 Hipocampo	18
1.4 Hipocampo, serotonina e a ansiedade	20
2. Objetivos	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Animais	29
3.2 Drogas	29
3.3 Aparatos	29
3.3.1 Teste do beber punido de Vogel	29
3.3.2 Tail-Flick	30
3.4 Cirurgia estereotáxica	30
3.5 Procedimentos e delineamento experimental	31
3.5.1 Análise histológica	35
3.5.2 Análise estatística	35
4. Resultados	37
5. Discussão	47
6. Conclusão	57
7. Referências	59
8. Anexo	68

Introdução

1. Introdução

1.1 Comportamentos defensivos e a ansiedade

A ansiedade é um estado emocional subjetivo caracterizado por alterações emocionais, fisiológicas e cognitivas frente à expectativa de uma situação indeterminada e imprecisa. Sabe-se que, até determinado nível, a ansiedade é essencial para a sobrevivência e possui grande valor adaptativo, favorecendo a motivação e o desempenho individual. Por outro lado, quando manifestada em níveis exacerbados e persistentes, pode tornar-se patológica e prejudicar o desempenho regular do indivíduo (GRAEFF, 1999).

A ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes transtornos segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais (DSM-V) (APA, 2013). Sua alta prevalência na população em geral faz com que estes transtornos estejam entre os maiores problemas de saúde pública, gerando grande custo econômico (YONKERS et al., 1998; BEREZA et al., 2009; BAXTER et al., 2014).

Dentre os transtornos de ansiedade, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) configura-se em um dos vários distúrbios mais observados na atualidade. O TAG é caracterizado por um estado de preocupação exacerbada e apreensão persistentes, ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses acompanhados por, pelo menos, três dos seguintes sintomas: inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e perturbações do sono. Esses sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou incapacitante nas atividades sociais e ocupacionais (APA, 2013).

O enquadramento da ansiedade em uma perspectiva biológica, mais especificamente sob o ponto de vista evolutivo, permitiu o avanço das investigações acerca da neurobiologia

destes transtornos através de estudos experimentais com uso de modelos animais (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Essa perspectiva evolutiva baseia-se na obra “The expression of the emotions in man and animals”, publicada originalmente em 1872 por Darwin, na qual propõe-se a existência de uma relação filogenética entre as respostas comportamentais de outros animais e as emoções observadas em humanos. Sob este ângulo, torna-se possível depreender que emoções relacionadas com o medo, como a ansiedade, teriam suas origens biológicas nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representem perigo ou ameaça à sobrevivência (GRAEFF, 1999).

No meio ambiente, o animal se defronta com diferentes níveis de ameaças, e, ainda que a natureza destes sinais, bem como o comportamento de defesa variem com a espécie, algumas estratégias de defesa padronizadas são adotadas (GRAEFF, 1999). Sob este ângulo, Blanchard e Blanchard (1988) propuseram três níveis de defesa baseados em respostas defensivas frente a diferentes níveis de ameaça.

O primeiro nível é atribuído à ameaça potencial, caracterizada pela incerteza da existência do perigo, o que ocasiona respostas de exploração cautelosa, avaliação de risco. Além disso, este tipo de ameaça suprime comportamentos não defensivos fornecendo uma medida indireta relacionada à ansiedade (BLANCHARD et al., 1998; SHUHAMA et al., 2007). Já no segundo nível está a ameaça distal, que consiste na presença do predador/estímulo aversivo, porém a uma distância segura, gerando respostas de fuga ou congelamento, relacionadas ao medo. O terceiro nível é atribuído a uma ameaça proximal, na qual o predador/estímulo aversivo encontra-se muito próximo ou em contato com a presa/indivíduo, gerando respostas de fugas explosivas ou ataques defensivos e está ligada à condição de medo intenso/pânico (GRAEFF, 1994; SHUHAMA et al., 2007).

Buscando refinar a distinção entre ansiedade e medo, McNaughton e Gray (2000) adicionaram a concepção de distância defensiva, a noção de direção defensiva. Desta maneira, quando o perigo é potencial e há necessidade de ser evitado, o comportamento característico seria a esquiva ativa. Já quando o perigo é potencial mas há uma necessidade de aproximação, haveria inibição comportamental juntamente com a avaliação de risco. Nesta situação é gerado um alto nível de conflito, onde há a necessidade do processamento da informação pelas estruturas que medeiam as tendências de esquiva e aproximação, e por aquelas que seriam responsáveis pelo nível mais complexo, atuando na resolução do conflito, com a definição da resposta mais apropriada após a comparação das tendências distintas.

A relação entre os níveis de defesa descritos acima e os diferentes transtornos de ansiedade é sustentada por experimentos de validação farmacológica (para revisão ver BLANCHARD et al., 2011). Drogas utilizadas no tratamento do TAG como os benzodiazepínicos, a buspirona e antidepressivos tricíclicos (tratamento crônico) reduzem a expressão dos comportamentos defensivos do primeiro nível, tais como avaliação de risco e a esquiva inibitória (BLANCHARD et al., 1993; 2001; BLANCHARD E MEYZA, 2019). Embora eficazes no tratamento da TAG, os benzodiazepínicos (exceto os de alta potência) e a buspirona são ineficazes no tratamento do pânico (TESAR E ROSENBAUM, 1993), da mesma forma que não alteram os comportamentos do segundo e terceiro nível, tais como congelamento, fuga ou ataques defensivos emitidos frente à aproximação do perigo (BLANCHARD et al., 1986). O tratamento crônico com fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina- ISRS) e imipramina (antidepressivo tricíclico), drogas eficazes tanto no tratamento do TAG como no transtorno do pânico, inibe tanto os comportamentos de avaliação de risco e esquiva como o de fuga (BLANCHARD et al., 2001).

Essa habilidade das drogas efetivas no tratamento do TAG em modular os comportamentos de avaliação de risco e esquiva suportam a visão de que estes comportamentos

estão relacionados a ansiedade, sendo uma característica focal do transtorno (BLANCHARD et al., 2011).

1.2 Sistemas neurais subjacentes aos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade.

Conforme descrito acima, existe uma relação filogenética entre as respostas comportamentais de outros animais e as emoções humanas. Essa relação sugere que os substratos neurais das emoções são conservados ao longo da evolução (GRAEFF, 1999). Em 1982, Panksepp propôs que as emoções básicas tais como a raiva, o medo, o pânico e a expectativa/ansiedade são representadas por um sistema neural inato que coordena as estratégias comportamentais permitindo aos animais lidarem com os desafios encontrados no ambiente.

Assim, acredita-se que as emoções, principalmente o medo e ansiedade, possuam grande valor adaptativo e que diferentes emoções estejam associadas a diferentes funções de sobrevivência, requerendo assim, a ativação de diferentes sistemas cerebrais. Sob esta perspectiva, diversos estudos clínicos e experimentais realizados nos últimos anos têm agregado conhecimento acerca da fisiopatologia dos diferentes transtornos de ansiedade (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). Com base nesses estudos, formulou-se a proposição de dois sistemas neurais que comandam as reações de defesa nos animais: o sistema cerebral aversivo e o sistema de inibição comportamental.

O sistema cerebral aversivo, proposto por Graeff (1981), compreende as estruturas relacionadas com as estratégias de defesa observadas em situações ameaçadoras ou de perigo iminente, tais como hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e a amígdala, produzindo, quando ativado, um aumento expressivo da atividade dirigida para o

ataque e fuga, além de estímulos condicionados que produzem respostas de esquivas e congelamentos.

Já o sistema de inibição comportamental (SIC), proposto por Gray e McNaughton (2000), estaria relacionado a ansiedade e seria ativado por situações em que coexistem dois planos conflitantes: a obtenção de segurança e tendência a aproximação da fonte de perigo. Desta maneira, a ativação desse sistema comportamental por estímulos novos ou aversivos desencadearia a supressão do comportamento em curso acompanhada de uma estratégia de avaliação de risco.

A principal representação neural do SIC é o sistema septo-hipocampal, que teria como função comparar os estímulos sensoriais recebidos do córtex entorrinal, com as previsões geradas no circuito de Papez (memória emocional). Esse sistema funcionaria de duas maneiras: como conferidor, quando os estímulos recebidos e esperados são coerentes, e como controlador, quando os estímulos recebidos são diferentes dos esperados, desencadeando um quadro de inibição comportamental. Ativando-se o modo controlador, a função do sistema septo-hipocampal é a de promover a inibição do comportamento em curso, com o objetivo de avaliar o grau da ameaça enquanto ocorre uma exploração cautelosa do ambiente, sendo essa reação de defesa caracterizada principalmente pelo comportamento de avaliação de risco. Assim, cabe ao sistema septo-hipocampal a função de checagem e resolução dos conflitos, de modo que em situações de conflito entre aproximação/esquiva, frente a um estímulo aversivo, promova um desequilíbrio na direção da esquiva.

Alguns estudos decorrentes da psicologia experimental desenvolvidos por Gray (1982) mostraram que os comportamentos derivados de lesões hipocâmpais e os decorrentes da ação de drogas ansiolíticas clássicas (barbitúricos e benzodiazepínicos) eram bastante similares. O mesmo foi observado por McNaughton e Gray (2000) com outras classes de drogas utilizadas

no tratamento de transtornos de ansiedade, como a buspirona (agonista de receptores serotoninérgicos) e a imipramina (antidepressivo tricíclico), sugerindo que tais drogas teriam seus efeitos decorrentes do prejuízo no funcionamento do SIC.

Refinando ainda mais a proposição relacionada a este sistema, Corr e McNaughton (2004) postularam que as respostas defensivas estariam organizadas em dois sistemas comportamentais paralelos, ambos modulados pelo sistema serotoninérgico. Um deles relacionado a aproximação defensiva e, portanto, a ansiedade, sendo recrutado em situações entre aproximação/esquiva. Já o outro, relacionado a esquiva defensiva e, portanto, ao medo ou pânico, dependendo da distância defensiva, sendo recrutado quando não há tendência em se aproximar da fonte de perigo. Nessa proposta, apesar de haver sobreposições significativas dos comportamentos controlados por cada um, o hipocampo e a amígdala mediarão ações ansiolíticas diferentes no sistema de aproximação defensiva, nas quais o hipocampo permaneceria como comparador e solucionador de conflitos de cunho cognitivo e emocional e a amígdala seria responsável pelo caráter afetivo associado à ansiedade.

1.3 Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura bilateral, que possui formato curvo e alongado e que, em roedores, se estende do eixo dorsal ao ventral, podendo ser dividido em hipocampo dorsal (HD) e hipocampo ventral (HV). Ambos os polos hipocámpais são compostos por 4 regiões: giro denteado (GD) e as três regiões do Corno de Amnon (CA1, CA2, CA3). O GD é a área de entrada do hipocampo, recebendo aferências vindas principalmente do córtex entorrinal. As aferências do GD se projetam para as regiões CA3 e CA2, que por sua vez seguem para a área de saída do hipocampo, a CA1, formando a via tri-sináptica hipocámpal (AMARAL; LAVENEX, 2007; DREMENCOV et al., 2003; FANSELOW; DONG, 2009).

Embora este padrão intrínseco de conectividade se repita basicamente ao longo de todo o seu eixo longitudinal (ANDERSEN; BLISS; SKREDE, 1971 Apud MOSER; MOSER, 1998. P. 609; FANSELOW E DONG; 2009; DALE et al., 2016), as vias aferentes e eferentes de conexão com outras estruturas encefálicas muda do polo dorsal para o polo ventral. O HD projeta suas eferências principalmente para regiões do neocórtex e recebe aferências principalmente da parte cortical lateral, formando uma rede cortical crítica com áreas que medeiam processos cognitivos como aprendizado, memória, navegação e exploração espacial. Já a conectividade do HV o coloca em uma situação ideal para regular o impacto das experiências emocionais e controlar estados afetivos gerais, uma vez que possui conexões bidirecionais com áreas subcorticais, tais como amígdala e hipotálamo, e recebe aferências das partes mais mediais do córtex entorrinal (DOLORFO; AMARAL, 1998; WITTER, 2001; FANSELOW; DONG, 2009).

A ideia de que o hipocampo não atua como uma estrutura unitária e, portanto, que seus polos funcionem de maneira diferente é baseada em três principais fatores congruentes. O primeiro deles é a diferença de conexões que chegam e partem dos seus polos, conforme descrito acima. A segunda é baseada em estudos de lesões químicas e eletrolíticas, que mostram que a função exploratória e de memória espacial seria dependente do polo dorsal. E a terceira, é que lesões no polo ventral, mas não no dorsal, mediarão respostas comportamentais de cunho emocional, principalmente àquelas relacionadas com a ansiedade (para revisão ver BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW; DONG, 2009).

Desta maneira, estes trabalhos atribuem ao HV o envolvimento nos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e ao HD uma função mais exploratória e um papel menos relevante na regulação de tais comportamentos (para revisão ver MOSER; MOSER, 1998; BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW; DONG, 2009). Entretanto, apesar desta divisão de funções evidenciadas principalmente por estudos de lesão, há também evidências que sugerem

que isso pode ser uma simplificação excessiva. As consequências da manipulação optogenética de populações neurais específicas do HD e HV levam a respostas comportamentais distintas dependentes do tipo de modelo comportamental utilizado. Assim, o silenciamento dos neurônios do GD dorsal, mas não ventral, prejudica a aquisição do condicionamento de congelamento evocado pelo contexto, indicando um efeito ansiolítico, e somente no polo ventral esse procedimento diminui a expressão das respostas defensivas da ansiedade inata medidas no labirinto em cruz elevado (LCE) e testes em campo aberto (KHEIRBERK et al 2012). Além disso, diversos estudos farmacológicos já demonstraram a participação do HD nos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade, como apresentado mais abaixo (GUIMARÃES et al., 1993, ANDREWS et al., 1994, ROMANIUK et al., 2001, DOS SANTOS et al., 2008; ALMADA et al., 2009).

1.4 Hipocampo, serotonina e a ansiedade

Dentre os neurotransmissores que estão envolvidos na mediação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, tem se atribuído grande destaque para a serotonina, que desempenha importante papel na modulação destes comportamentos (para revisão ver GRIEBEL, 1995; GRAEFF, 2002; GUIMARÃES et al. 2010), assim como nas diferentes funções hipocâmpais (HJORTH, et al., 2000; BERUMEN et al., 2012; DALE et al., 2016). Por exemplo, tem sido proposto que um aumento da neurotransmissão serotoninérgica em áreas-chaves como o hipocampo parece ser necessário para que diferentes classes de drogas utilizadas no tratamento dos transtornos de ansiedade, tais como, os antidepressivos fluoxetina (inibidor da recaptação seletiva de serotonina- IRSS) e imipramina, apresentem seus efeitos terapêuticos (para revisão ver BLIER; EL MANSARI, 2013).

As primeiras evidências relacionando a serotonina com a ansiedade foram obtidas em estudos utilizando modelos animais que envolvem conflito. Nesses modelos, o comportamento

operante do animal é, ao mesmo tempo, mantido pela apresentação de uma recompensa e suprimido pela apresentação de estímulos aversivos, como por exemplo, choques elétricos (GELLER; SEIFER, 1960). Nestes modelos de conflito foi demonstrado que a estimulação do sistema serotoninérgico acionaria o sistema de punição cerebral induzindo um aumento na resposta de inibição comportamental, sendo, portanto, ansiogênico (ROBICHAUD; SLEDGE, 1969; GELLER; BLUM, 1970; GRAEFF; SCHOENFELD, 1970; WISE et al., 1972). No entanto, outros estudos utilizando como modelo a estimulação elétrica da SCPd mostravam um papel antiaversivo do neurotransmissor na modulação das respostas defensivas relacionadas ao pânico, como a fuga (KISER; LEOVITZ, 1975; SCHENBERG; GRAEFF, 1978; KISER et al., 1978;).

Deakin e Graeff (1991) propuseram uma teoria que tem por objetivo explicar esse papel dual da serotonina na ansiedade e no pânico, na qual a serotonina facilitaria as respostas defensivas relacionadas à ansiedade, como a esquivas inibitória, e ao contrário, inibiria as respostas defensivas relacionadas ao pânico, como a fuga. Uma série de estudos buscando investigar quais substratos neurais estariam envolvidos nessa dualidade encontraram que a serotonina facilitava a resposta de esquivas inibitória (relacionada ao transtorno de ansiedade generalizada) por agir em estruturas prosencefálicas, como o sistema septo-hipocampal e amígdala, e inibia a resposta de fuga (relacionada ao transtorno do pânico) promovida pela SCPd e hipocampo medial (para revisão ver GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

A serotonina tem sua origem nos núcleos da rafe, principalmente no dorsal (NDR) e no mediano (NMR), e suas projeções vão para conjuntos distintos de estruturas cerebrais (WISE et al., 1972; DEAKIN; GRAEFF, 1991; MILLAN, 2003; HENSLER, 2006). O hipocampo é um dos principais alvos dessas projeções serotoninérgicas, com origem tanto no NMR, quanto no

NDR (O'KEEFE; NADEL, 1978; IMAI et al., 1986; MOLLIVER, 1987; WEST, 1990; MCKENNA; VERTES, 2001; DREMENCOV et al., 2003; AMARAL; LAVENEX, 2007).

O NMR envia projeções tanto para o HD quanto para o HV (MOLLIVER, 1987, MCKENNA; VERTES, 2001; MUZERELE et al., 2016). Estudos recentes utilizando optogenética mostram que a ativação do NMR aumenta a ansiedade em testes como o LCE, alimentação suprimida pela novidade e *marble burying*. Mais do que isso, eles atribuem parte deste efeito a ativação dos terminais serotoninérgicos tanto no HD (ABELA et al., 2020) quanto no HV (OHMURA et al., 2019). Vale ressaltar que o NDR envia projeções, a partir do seu subnúcleo caudal, apenas para o HV (IMAI et al., 1986, MOLLIVER, 1987), sendo esta uma importante diferença entre os polos.

Curiosamente, as fibras serotoninérgicas geralmente não possuem contatos sinápticos diretos e, em muitos casos, os receptores serotoninérgicos foram detectados em neurônios que não recebem inervação serotoninérgica. Isso sugere que, no hipocampo, assim como em outras áreas do encéfalo, a serotonina é liberada difusamente por transmissão de volume e atua mais como um neuromodulador cuja função pode ser manter a homeostase. As ações diversas da serotonina decorrem de sua interação com pelo menos 14 subtipos de receptores diferentes, agrupados em 7 famílias, com características e padrões de expressão distintos (para revisão ver DALE et al., 2016).

Tanaka e colaboradores (2012), utilizando a técnica de hibridização *in situ* em camundongos, descreveram os perfis de expressão dos RNA mensageiro (RNAm) para os receptores serotoninérgicos ao longo do eixo dorsoventral do hipocampo. Dentre, pelo menos, os 14 subtipos de receptores serotoninérgicos já descritos (HANNON; HOYER, 2008; HOYER; HANNON; MARTIN, 2002), eles observaram a expressão dos subtipos 1A, 1B, 1F, 2A, 2C, 3A, 4, 5A, 5B e 7 ao longo de todo hipocampo. Observaram ainda que o perfil de expressão

dos RNAm era diferente ao longo do eixo dorsoventral, assim como nas sub-regiões do hipocampo. Em termos de receptores do subtipo 5-HT1A, foco principal do presente trabalho, este estudo indicou haver uma forte expressão desses sítios de ligação na camada CA1 do HD, ao passo que, no HV observou-se que o perfil de expressão era mais abundante e localizado principalmente em CA3 e GD.

O receptor 5-HT1A está acoplado à proteína $G\alpha i/0$ e, portanto, promove uma hiperpolarização neuronal, via abertura dos canais de potássio e/ou inibição da adenilato ciclase. No hipocampo, o receptor 5-HT1A apresenta-se amplamente expresso, sendo o mais expresso dentre os receptores serotoninérgicos nesta região (POMPEIANO et al 1992, 1994; ABRAMOWSKI et al., 1995; CLEMETT et al., 2000; HANNON; HOYER, 2008; BERUMEN et al 2012).

Uma série de estudos mostra a participação dos receptores 5-HT1A hipocampais no mecanismo de ação dos fármacos antidepressivos. O tratamento crônico com a imipramina e a fluoxetina, por exemplo, aumentam a responsividade de receptores 5-HT1A localizados em neurônios piramidais hipocampais (CHAPUT DE MONTIGNY; BLIER, 1991). Neste sentido, através da deleção genética de receptores 5-HT1A, Samuels e colaboradores (2016) demonstraram que estes receptores localizados nas células granulares do GD são críticos para o efeito ansiolítico e antidepressivo promovidos pelo tratamento crônico com a fluoxetina.

Dentro desta perspectiva, diversos estudos têm sido realizados buscando investigar a participação dos receptores 5-HT1A em cada um dos polos hipocampais nos comportamentos defensivos relacionados com a ansiedade.

Em termos de HD, diversos trabalhos com injeções local do agonista de receptores 5-HT1A 8-OH-DPAT evidenciam a importância desses receptores na regulação da ansiedade (ANDREWS et al., 1994; FILE; GONZALEZ; ANDREWS, 1996; JOLAS, et al., 1995;

MENARD; TREIT, 1998; SCHREIBER; DEVRY, 1993). Por exemplo, Dos Santos e colaboradores (2008), utilizando o teste do labirinto em T elevado (LTE), demonstraram que a administração do 8-OH-DPAT nesta subárea facilitou a aquisição do comportamento de esquiva inibitória, um efeito ansiogênico. Além disso, observou-se também que a desinibição dos neurônios serotoninérgicos do NMR levava a um efeito ansiogênico no LTE e que esse efeito era mediado pelos receptores 5-HT1A do HD, uma vez que o bloqueio farmacológico prévio de tais receptores preveniu a manifestação destes efeitos (DOS SANTOS et al., 2008).

No que diz respeito à HV, é surpreendente que poucos estudos até agora tenham abordado o papel desempenhado pelos receptores 5-HT1A na gênese / regulação da ansiedade, e seus resultados são aparentemente conflitantes. Enquanto Fuss et al. (2013) relataram efeito ansiogênico decorrente da diminuição da função dos receptores 5-HT1A neste polo do hipocampo, File e colaboradores (1996) observaram que a injeção local do 8-OH-DPAT não teve efeito em ratos submetidos ao teste de interação social e LCE. Já Kümpel e colaboradores (2016) mostraram que a administração intra-HV de 8-OH-DPAT provocou prejuízo na tarefa de esquiva inibitória no teste do LTE, indicando um efeito ansiolítico.

Essa última evidência parece indicar que ao contrário do HD, a ativação de receptores do tipo 5-HT1A no HV provoca um efeito do tipo ansiolítico, apontando para uma dualidade do efeito da serotonina nos dois polos hipocampais.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo estender as investigações acerca do papel dos receptores 5-HT1A localizados no HD e no HV na predição de respostas comportamentais associadas à ansiedade.

Para investigar a generalidade dos efeitos obtidos previamente no modelo do LTE, inicialmente avaliamos as consequências de injeções intra-HD ou intra-HV de serotonina e de drogas que interagem com os receptores 5-HT1A em ratos submetidos ao teste de beber punido

de Vogel. O teste de beber punido de Vogel é um modelo experimental preditivo de ansiedade baseado no conflito entre um comportamento motivado e um estímulo aversivo. Neste teste, os animais previamente privados de água são expostos a uma caixa com acesso ao consumo, porém o comportamento de beber a água é punido com um choque elétrico na língua, gerando o conflito (para revisão ver MILAN, 2003).

Com relação à participação dos receptores 5-HT_{1A} presentes no hipocampo no mecanismo de ação dos antidepressivos, Sant'Ana (2017) mostrou que o efeito do tipo ansiogênico promovido pela administração aguda de fluoxetina e de imipramina é anulado pela administração prévia de WAY-100635 no HD. Partindo desses resultados e de evidências na literatura que mostram que o tratamento com antidepressivos a longo prazo altera a sensibilidade dos os receptores 5-HT_{1A} no hipocampo (BLIER; ABBOTT, 2001; DREMENCOV et al., 2003; GORDON; HEN, 2004), nos perguntamos se o tratamento crônico com estes antidepressivos seria capaz de alterar o efeito ansiogênico decorrente da administração intra-HD de 8-OH-DPAT no teste do beber punido de Vogel.

Objetivos

2 Objetivos:

Estender as investigações acerca dos efeitos comportamentais desencadeados pela manipulação farmacológica de receptores 5-HT_{1A} no HD e no HV no modelo de conflito de Vogel.

Objetivos específicos:

- Investigar os efeitos causados pela a injeção intra-HD ou intra-HV do agonista endógeno serotonina, e de 8-OH-DPAT e WAY-100635, agonista e antagonista de receptores 5-HT_{1A}, respectivamente, em ratos submetidos ao teste de beber punido de Vogel.

- Investigar se o tratamento prévio intra-HV com WAY-100635 bloqueia a resposta comportamental causada pela injeção local de serotonina e de 8-OH-DPAT, em ratos submetidos ao teste de beber punido de Vogel.

- Investigar se o tratamento crônico com a fluoxetina ou a imipramina altera a resposta comportamental causada pela injeção de 8-OH-DPAT no HD.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (220 – 350 gramas) provenientes dos Biotérios Centrais da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto e da Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Botucatu, que permaneceram no Biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento da FMRP/USP, onde ficaram alojados (4 animais/caixa) em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm), forradas com serragem. Os animais tiveram livre acesso a água e a comida durante todo o experimento, exceto, no caso de água, nos períodos de privação assinalados abaixo como parte da execução do teste de Vogel. O biotério foi mantido à temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de claro-escuro de 12 horas, sendo o período iluminado das 7:00 às 19:00 horas com intensidade de 60 lux. Todos os procedimentos adotados neste trabalho foram aprovados pela CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Registro 118/2018).

3.2 Drogas

Serotonina (5- Hydroxytryptamine hydrochloride,; Sigma-Aldrich, EUA), 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino); Sigma-Aldrich, EUA), WAY 100635 (N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N(2,piridinil ciclohexanocarboxamida maleato); Sigma-Aldrich, EUA), imipramina (Imipramine hydrochloride- Sigma-Aldrich, EUA) e fluoxetina (cloridrato de fluoxetina- Cristália, Brasil). As drogas foram dissolvidas em salina estéril 0,9%, com exceção da fluoxetina que foi dissolvida em salina com 2% de Tween 80 (Sigma, EUA).

3.3 Aparatos

3.3.1 Teste do beber punido de Vogel

O conjunto do aparato empregado no teste é composto por uma caixa de acrílico transparente (42 x 25 x 20 cm), que possui uma grade metálica no assoalho e um bebedouro

acoplado (contendo água), que projeta um bico também metálico em seu interior, sendo que esse conjunto é colocado dentro de uma caixa com proteção acústica. O contato do animal com o bico e o assoalho fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (Insight, Brasil), que produz 7 pulsos/s quando o animal está em contato com os dois componentes. Cada pulso foi considerado uma lambida e a cada 20 lambidas, o animal recebeu pelo bico, um choque elétrico de 0,5 mA, durante dois segundos. O sensor registrou o número de lambidas e de choques durante o período do teste (3 minutos).

3.3.2 Tail-Flick

O teste de tail-flick foi realizado com o intuito de investigar o efeito das drogas na nocicepção. Ele foi executado em um equipamento automatizado (Ugo Basile, Itália), que possibilita medir com precisão o limiar nociceptivo ao estímulo de calor infravermelho aplicado na cauda do animal. O aparelho de tail-flick consiste basicamente de uma fonte (lâmpada) de radiação infravermelha cuja intensidade ajustável é focada na cauda do animal por um espelho parabólico incorporado. O operador inicia o estímulo, e quando o animal sente dor e retira a cauda, um sensor faz a detecção para o temporizador e apaga a lâmpada. O tempo de reação do animal é assim determinado.

A intensidade da luz foi ajustada para atingir latências basais de 8 a 10 s. Uma latência máxima de 15 s foi estabelecida para minimizar os danos na cauda (BASSI et al., 2017; SANT'ANA et.al, 2019).

3.4 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich) a 2,5% (10mL/kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após a tricotomia da região da cabeça, foi realizada antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 2% (PVPI) e injeção subcutânea do anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um

vasoconstritor (Novocol® 100, S.S. White-Brasil). Foi realizada uma incisão longitudinal dos tecidos cutâneos e subcutâneos, e a remoção do periósteo por raspagem, a fim de expor o crânio. Através de orifícios na superfície craniana, perfurados utilizando-se uma broca, cânulas guias de 0,6 mm de diâmetro externo e 10 mm (para o HD) ou 12 mm (para o HV) de comprimento foram implantadas bilateralmente no encéfalo. As cânulas foram direcionadas ao HD ou HV, de acordo com as seguintes coordenadas: HD: antero-posterior = - 3,9 mm, latero-lateral = $\pm$ 2,8 mm e dorso-ventral = - 2,1 mm; HV: antero-posterior = - 5,0 mm, latero-lateral = $\pm$ 5,2 mm e dorso-ventral = - 4,0 mm, ambas com inclinação da haste = 0° e tendo o Bregma como referência (PAXINOS; WATSON, 2007). Após o posicionamento das cânulas, estas permaneceram fixadas aos orifícios através de um capacete de acrílico feito de resina autopolimerizante, estabilizado por um parafuso fixado ao crânio. Um fio de aço (0.2 mm de diâmetro) foi colocado dentro de cada uma das cânulas para evitar a obstrução das mesmas. Ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil), a fim de prevenir possíveis infecções. Além disto, foi administrado fluxinina meglumina (2,5 mg/mL/kg, s.c), um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética.

3.5 Procedimentos e delineamento experimental

Em todos os experimentos, as injeções centrais foram feitas simultaneamente nos dois hemisférios cerebrais por meio de duas agulhas odontológicas (Mizzy, comprimento= 11,5 mm para o HD ou 15 mm para o HV), inseridas pelas cânulas guia, até atingir o alvo a 1,5 (HD) ou 3,0 mm (HV) abaixo da extremidade das cânulas. Cada agulha odontológica foi conectada a uma microseringa (Hamilton 701-RN, EUA) de 10 µl através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido com água destilada. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno auxiliou na verificação da efetividade da microinjeção. Para controle do volume e

do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba microinjetora digital (Harvard Apparatus, modelo 55-2222) programada para a administração de um volume de 0,2 μ l, a uma taxa de 0,1 μ l/min. Ao término da injeção, a agulha permaneceu no local por mais um minuto para evitar o refluxo da droga.

Experimento 1: Efeitos da estimulação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal em ratos submetidos ao teste de Vogel

No experimento 1A, grupos independentes de animais receberam injeções intra-HD de salina (n = 9) ou 8-OH-DPAT (0,55, 1,67, 5 ou 15 nmol, n = 6-10). Já no experimento 1B, os animais foram injetados intra-HD com salina (n = 8) ou serotonina (16 nmol, n = 10). Dez minutos após as injeções, os ratos foram submetidos ao teste de Vogel.

Para o teste de Vogel, dois dias antes do início das análises comportamentais, os animais foram manuseados pelo experimentador, uma vez ao dia, durante 5 minutos. Os animais foram privados de água por 48 horas antes da execução do teste. Após as primeiras 24 horas, os animais foram submetidos a uma sessão treino, durante a qual tiveram acesso livremente à água por 3 minutos na caixa de execução do teste. No dia seguinte a sessão treino, após a administração das drogas, os animais foram individualmente colocados na caixa-teste por três minutos, contados a partir do momento em que encontraram o bico do bebedouro. Durante este período, a cada 20 lambidas, os animais receberam, através do bico do bebedouro, um choque de 0,5 mA durante dois segundos. Os animais que não encontraram o bico do bebedouro foram retirados do teste e excluídos da análise.

No experimento 1C, investigamos o efeito destas drogas sobre a nocicepção, uma variável que potencialmente pode interferir nos resultados obtidos no teste de Vogel. Para isso, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de tail-flick, seguindo o seguinte protocolo: os animais foram gentilmente contidos pelo experimentador e o terço inferior da

cauda foi colocado sobre a fonte de calor com intensidade já estabelecida. O tempo de reação foi registrado. Dez minutos após a tomada do valor basal de retirada da cauda, os ratos receberam injeções intra-HD de salina (n = 8), serotonina (16 nmol, n = 6) ou 8-OH-DPAT (5 nmol, n = 9) e, dez minutos após, foi redeterminada a latência da retirada da cauda. O resultado foi expresso através da variação percentual da latência para retirada da cauda, calculado através da fórmula: $[(\text{valor da latência pós droga} - \text{valor basal}) / \text{valor basal}] \times 100$.

Experimento 2: Efeitos da estimulação de receptores 5-HT1A no hipocampo ventral em ratos submetidos ao teste de Vogel.

No experimento 2A, grupos independentes de animais receberam injeções intra-HV de salina (n = 8), 8-OH-DPAT (3 ou 15 nmol, n = 6-10) ou serotonina (16 nmol, n = 10). Já no experimento 2B, os animais receberam injeções intra-HV de salina (n = 7) ou WAY-100635 (0,18, 0,37 e 0,74 nmol, n = 7-8) e foram submetidos ao teste de beber punido de Vogel, conforme descrito no experimento 1.

Afim de verificar se o efeito da serotonina, bem como o do 8-OH-DPAT, era mediado por receptores 5-HT1A, no experimento 2C, dez minutos após receberem injeção intra-HV de WAY-100635 (0,09 nmol) ou salina, os animais receberam injeções intra-HV de salina ou serotonina (16 nmol). Os seguintes grupos foram formados: SAL/SAL (n = 11); WAY/SAL (n = 12); SAL/5-HT (n = 8) e WAY/5-HT (n = 9).

Já no experimento 2D, dez minutos após receberem injeção intra-HV de WAY-100635 (0,09 nmol) ou salina, os animais receberam injeções intra-HV de salina ou 8-OH-DPAT (15 nmol). Os seguintes grupos foram formados SAL/SAL (n = 8); WAY/SAL (n = 7); SAL/8-OH-DPAT (n = 9) e WAY/8-OH-DPAT (n = 7).

Nos dois experimentos, dez minutos após a última microinjeção, os animais foram submetidos ao teste de Vogel, conforme descrito no experimento 1.

Como no experimento 1, grupos independentes de animais foram utilizados para investigação do efeito destas drogas na nocicepção por meio do teste de Tail-Flick. Para isso no experimento 2E, os animais foram gentilmente contidos pelo experimentador e o terço inferior da cauda foi colocado sobre a fonte de calor com intensidade já estabelecida. O tempo de reação foi registrado. Dez minutos após a tomada do valor basal de retirada da cauda, os ratos receberam injeções intra-HV de salina ($n = 6$), serotonina (16 nmol; $n = 6$), 8-OH-DPAT (15 nmol, $n = 6$) ou WAY-100635 (0,74 nmol, $n = 5$) e, dez minutos após, foi redeterminada a latência da retirada da cauda.

Experimento 3: Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou imipramina sobre o efeito causado pela injeção intra-HD de 8-OH-DPAT no teste de Vogel.

No experimento 3A, grupos independentes de animais foram tratados durante 21 dias com injeções intraperitoneais de veículo ou de fluoxetina (10mg/kg/dia). Já no experimento 3B, os animais receberam, pelo mesmo período tempo, injeções intraperitoneais de imipramina (5mg/kg/dia) ou salina. Entre o 14° e o 16° dia de tratamento, foi realizada a cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guias direcionadas ao HD, conforme descrito acima. No dia do teste, os animais receberam a última injeção dos seus respectivos tratamentos. Três horas após, os animais foram administrados com salina ou 8-OH-DPAT (5 nmol) no HD. Os seguintes grupos foram formados: Experimento 3A: VEIC/SAL ($n = 7$); FLU/SAL ($n = 8$); VEI/8-OH-DPAT ($n = 6$); FLU/8-OH-DPAT ($n = 6$). Experimento 3B: SAL/SAL ($n = 7$); IMI/SAL ($n = 6$); SAL/8-OH-DPAT ($n = 7$); IMI/8-OH-DPAT ($n = 8$).

Nos dois experimentos, dez minutos após as injeções no HD, os animais foram submetidos ao teste de Vogel, conforme descrito no experimento 1.

3.5.1 Análise histológica

Ao término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uretana 25% (10 ml/kg) e 0,2µL de corante azul de Evans a 1% foi administrado no HD ou HV. Posteriormente, foram submetidos a perfusão intracardíaca com salina (NaCl a 0,9%) e formol (10%). Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e fixados em formol a 10%. Os encéfalos foram cortados em secções coronais de 50µm de espessura em um criostato (Leica CM1850) para verificação microscópica do sítio de microinjeção.

3.5.2 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos 1A, 1C, 2A, 2B e 2E foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via. No experimento 1B foi utilizado o teste t-student para análise dos resultados. Já os dados dos experimentos 2C, 2D e 3 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, tendo como fatores independentes os dois tratamentos farmacológicos usados. Quando apropriado foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

Resultados

4. Resultados

Experimento 1: Efeitos da estimulação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal em ratos submetidos ao teste de Vogel

A figura 1 mostra os sítios de injeções dentro e fora do HD das drogas empregadas nos experimentos 1A, 1B e 1C.

Figura 1. Representação de sessões coronais do cérebro de rato mostrando a localização dos sítios de injeção dentro (círculos pretos) e fora (círculos brancos) do HD nos experimentos 1A, 1B e 1C. As figuras representam as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (2007) a partir do bregma. O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

A figura 2A mostra que a injeção intra-HD de 8-OH-DPAT alterou o número de lambidas punidas no teste de beber punido de Vogel [$F(4,34) = 4,90$; $p < 0,05$]. O teste post hoc de Duncan mostrou que o tratamento com o 8-OH-DPAT, nas doses de 5 e 15 nmol, diminuiu o número de lambidas punidas quando comparado ao grupo controle, indicando um efeito do tipo ansiogênico. Como pode ser visto na mesma figura (painel à direita), este efeito não foi observado nos animais com injeções localizadas fora do HD [$F(2,11) = 0,98$; NS].

Como mostrado na figura 2B, a injeção intra-HD de serotonina também diminui o número de lambidas punidas no animais com sítios de injeção dentro [$t(16) = 3,38$; $p < 0,05$], mas não fora do HD [$t(7) = 0,88$; NS].

Figura 2. Efeito (média $\pm$ EPM) causado pelas injeções dentro ou fora do HD de salina ou 8-OH-DPAT (painel 2A), e de salina ou 5-HT (16 nmol; painel 2B), no número de lambidas punidas no teste de Vogel. (n) = número de animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A tabela 1 mostra que nenhuma das drogas utilizadas no experimento 1 alterou a latência para retirada da cauda no teste do tail-flick ($F(3,25) = 1,84$; $p = 0,54$).

Tabela 1. Efeito (média $\pm$ EPM) causados pela manipulação farmacológica de receptores 5-HT1A no HD e no HV no teste de tail-flick.

Tratamento (nmol)	N	* Variação percentual da latência (%)
<i>Experimento 1: HD</i>		
Salina	8	-2,47 $\pm$ 4,03
5-HT (16)	6	5,98 $\pm$ 4,52
8-OH-DPAT (5)	9	-3,97 $\pm$ 2,97
<i>Experimento 2: HV</i>		
Salina	6	0,02 $\pm$ 5,98
5-HT (16)	6	-2,00 $\pm$ 3,33
8-OH-DPAT (15)	6	-3,05 $\pm$ 3,29
WAY-100635 (0,74)	5	0,81 $\pm$ 3,02
*variação percentual da latência = [(valor da latência pós droga- valor basal) / valor basal]x100		

Experimento 2: Efeitos da manipulação farmacológica de receptores 5-HT1A no HV em ratos submetidos ao teste de Vogel.

A figura 3 mostra os sítios de injeções dentro e fora do HV das drogas empregadas nos experimentos 2A, 2B, 2C e 2D.

Figura 3. Representação de sessões coronais do cérebro de rato mostrando a localização dos sítios de injeção dentro (círculos pretos) e fora (círculos brancos) do HV nos experimentos 2A, 2B, 2C e 2D. As figuras representam as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (2007) a partir do bregma. O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

A figura 4A mostra que as injeções de 8-OH-DPAT e de serotonina alteraram o número de lambidas punidas no teste Vogel, quando localizadas dentro [$F(3,30) = 5,20$; $p < 0,05$], mas não

fora do HV [$F(2,10) = 3,24$; NS]. O *post hoc* de Duncan mostrou que os tratamentos com 8-OH-DPAT, na dose de 15 nmol, e com a serotonina, na dose de 16 nmol aumentaram o número de lambidas punidas quando comparado ao grupo controle, indicando um efeito ansiolítico.

A figura 4B mostra que o tratamento com WAY-100635 alterou o número de lambidas punidas no teste de Vogel, quando localizado dentro [$F(3,28) = 8,35$; $p < 0,05$], mas não fora do HV [$F(2,8) = 1,14$; NS]. Nos animais do primeiro grupo, o *post hoc* de Duncan mostrou que todas as doses deste antagonista diminuíram o número de lambidas punidas quando comparadas ao grupo controle, indicando um efeito ansiogênico.

Figura 4. Efeito (média $\pm$ EPM) causado por injeções dentro ou fora do hipocampo ventral (HV) de salina, 5-HT ou 8-OH-DPAT (painel 4A), ou salina ou WAY100635 (painel 4B) no número de lambidas punidas no teste de Vogel. (n) = número de animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, + $p < 0,05$ comparado a todos os grupos.

A figura 5A ilustra o efeito causado pela administração combinada de WAY-100635 e de serotonina em animais com injeções dentro e fora do HV. No animais com injeções dentro [Fator tratamento como o antagonista – $F(3,53) = 12,22$; $p < 0,05$; tratamento com o agonista – $F(3,53) = 1,90$; NS; interação entre os fatores – $F(3,53) = 4,30$; $p < 0,05$], mas não fora [Fator tratamento como o antagonista – $F(3,15) = 0,20$; NS; tratamento com o agonista – $F(3,15) =$

0,74; NS; interação entre os fatores – $F(3,15) = 0,35$; NS], a administração prévia de WAY-100635 bloqueou o aumento no número de lambidas punidas causados pela serotonina.

A figura 5B ilustra o efeito causado no teste de Vogel pela administração combinada de WAY-100635 e de 8-OH-DPAT em animais com injeções dentro e fora do HV. No animais com injeções dentro [Fator tratamento como o antagonista – $F(3,27) = 11,19$; $p < 0,05$; tratamento com o agonista – $F(3,27) = 3,55$; NS; interação entre os fatores – $F(3,27) = 7,09$; $p < 0,05$], mas não fora [Fator tratamento como o antagonista – $F(3,17) = 0,92$; NS; tratamento com o agonista – $F(3,17) = 0,70$; NS; interação entre os fatores – $F(3,17) = 0,28$; NS], a administração prévia de WAY-100635 bloqueou o aumento no número de lambidas punidas causados pelo 8-OH-DPAT.

Figura 5. Nos painéis 5A e 5B são mostrados os efeitos (média $\pm$ EPM) causados, respectivamente, por injeções combinadas de WAY-100635 (0,09 nmol) e 5-HT (16 nmol) ou de WAY-100635 (0,09 nmol) e 8-OH-DPAT (15 nmol) dentro e fora do HV. (n) = número de animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, + $p < 0,05$ comparado a todos os demais.

Conforme mostrado na tabela 1, nenhuma das drogas utilizadas alterou a latência para retirada da cauda no teste do tail-flick [$F(3,19) = 0,20$; $p = 0,89$].

Experimento 3: Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou imipramina sobre o efeito causado pela injeção intra-HD de 8-OH-DPAT no teste de Vogel.

A figura 6 mostra os sítios de injeções dentro e fora do HD das drogas empregadas nos experimentos 3A e 3B.

Figura 6. Representação de sessões coronais do cérebro de rato mostrando a localização dos sítios de injeção dentro (círculos pretos) e fora (círculos brancos) do HD no experimento A e B. As figuras representam as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson (2007) a partir do Bregma. O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

A figura 7A ilustra o efeito causado no teste de Vogel pela administração combinada de fluoxetina (i.p) e de 8-OH-DPAT em animais com injeções dentro e fora do HV. No animais com injeções dentro [Fator tratamento crônico com fluoxetina – $F(3,24) = 2,47$; NS; tratamento com o agonista – $F(3,24) = 3,70$; NS; interação entre os fatores – $F(3,24) = 6,12$; $p < 0,05$], mas não fora [Fator tratamento crônico com fluoxetina – $F(3,14) = 0,11$; NS; tratamento com o agonista – $F(3,14) = 0,45$; NS; interação entre os fatores – $F(3,53) = 0,89$; NS], o tratamento crônico com fluoxetina cancelou o efeito ansiogênico causado pela administração de 8-OH-DPAT.

A figura 7B ilustra o efeito causado no teste de Vogel pela administração combinada de imipramina (i.p) e de 8-OH-DPAT, em animais com injeções dentro e fora do HV. No animais com injeções dentro [Fator tratamento crônico com imipramina – $F(3,27) = 4,65$; $p < 0,05$; tratamento com o agonista $F(3,27) = 4,66$; $p < 0,05$; interação entre os fatores – $F(3,27) = 4,19$; $p < 0,05$], mas não fora [Fator tratamento crônico com imipramina – $F(3,14) = 0,95$; NS; tratamento com o agonista – $F(3,14) = 0,96$; NS; interação entre os fatores – $F(3,14) = 1,43$; NS], o tratamento crônico com imipramina cancelou o efeito ansiogênico causado pela administração de 8-OH-DPAT.

Figura 7. Nos painéis 7A e 7B são mostrados os efeitos (média $\pm$ EPM) causados, respectivamente, por injeções combinadas de fluoxetina (FLU, 10 mg/kg/dia) e 8-OH-DPAT (DPAT, 5 nmol) ou de imipramina (IMI, 5 mg/kg/dia) e 8-OH-DPAT (15 nmol) dentro e fora do HV. VEÍ = veículo; SAL = salina; (n) = número de animais em cada grupo. + $p < 0,05$ comparado a todos os grupos.

Discussão

5. Discussão

O objetivo deste trabalho foi estender as investigações acerca do papel dos receptores 5-HT1A no HD e no HV na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade.

Os resultados obtidos sugerem que a ativação dos receptores 5-HT1A nestes dois polos hipocâmpais promove efeitos opostos no teste de conflito de Vogel.

Em termos de ativação deste receptor no HD, foi possível observar que, no experimento 1 tanto as duas maiores doses de 8-OH-DPAT (5 e 15 nmol), como a dose de serotonina testada (16 nmol), foram capazes de provocar a diminuição do número de lambidas punidas, sugestivo de efeito ansiogênico. Como evidenciado no teste do tail-flick, este efeito não é decorrente de uma ação inespecífica destas drogas sobre o limiar de dor destes animais. Em concordância com os nossos achados, uma série de trabalhos na literatura, utilizando diferentes testes comportamentais, tais como o teste de interação social (ANDREWS et al 1994, FILE et al 1996, CHEETA et al 2000), o teste de transição claro/escuro (ROMANIUK et al 2001) e o LTE (DOS SANTOS et al 2008), também mostram que a ativação de receptores do tipo 5-HT1A localizados no HD aumenta a ansiedade. Entretanto, resultados conflitantes também são encontrados (KATAOKA et al., 1990; SCHREIBER; DE VRY, 1993; PRZEGALINSKI et al., 1994; JOLAS, 1995). Por exemplo, Jolas e colaboradores (1995) mostraram que a injeção de 8-OH-DPAT no HD provocou ansiólise no teste da vocalização ultrassônica induzida por choques elétricos.

Embora ainda não exista uma razão clara para estes resultados conflitantes, há na literatura algumas discussões a esse respeito (ANDREWS et al., 1994; THOMAS et al., 1998; DOS SANTOS et al., 2008). Uma delas sugere que esta oposição seja derivada das doses utilizadas de 8-OH-DPAT, onde doses menores seriam responsáveis por um aumento na ansiedade, e doses maiores pela ansiólise (ANDREWS et al., 1994). Isso se daria em função da perda de

especificidade da droga, que também possui afinidade, ainda que menor, por receptores do subtipo 5-HT₇ (ANDREWS et al., 1994; THOMAS et al., 1998).

De maior relevância para este estudo estão os trabalhos envolvendo os testes de conflito, como o Geller-Seifer e o beber punido de Vogel (SCHREIBER; DE VRY, 1993; PRZEGALINSKI et al., 1994), que também mostram que a administração de 8-OH-DPAT no HD causa efeito ansiolítico. Mais especificamente, Przegalinski e colaboradores (1994) observaram um aumento no número de lambidas punidas após a injeção intra-HD de 4 e 12 nmol de 8-OH-DPAT, resultado oposto ao encontrado no presente trabalho, onde as doses de 5 e 15 nmol levaram a uma diminuição na expressão desse comportamento.

Uma possível explicação para este conflito de resultados no mesmo teste surge através dos achados de Jolas (1995). Utilizando autorradiografia, o autor mostrou que o 8-OH-DPAT, injetado num volume de 0,5 µl no HD, foi capaz de se difundir até o NDR, sugerindo que os efeitos ansiolíticos observados após a injeção da droga seriam decorrentes da ativação dos receptores 5HT_{1A} pré-sinápticos no NDR. Nesse sentido, Przegalinski e colaboradores (1994), que também encontraram efeitos ansiolíticos com a injeção de 8-OH-DPAT, injetaram 1 µl/sítio no HD, um volume ainda maior que o de Jolas (1995), o que parece corroborar a ideia de que o efeito ansiolítico é decorrente da difusão desta droga. É importante ressaltar que no presente trabalho o volume injetado foi menor (0,2 µl/sítio) do que o utilizado no trabalho de Jolas (1995), o que pode ter minimizado a possibilidade de difusão. Além disso, em nosso laboratório, Dos Santos e colaboradores (2008) mostraram que a desinibição dos neurônios serotoninérgicos do NMR leva a um efeito ansiogênico no LTE, como aqui observado após a injeção de 8-OH-DPAT no HD. Os autores mostraram ainda que esse efeito é mediado pelos receptores 5-HT_{1A} do HD, uma vez que o bloqueio farmacológico prévio de tais receptores preveniu a manifestação destes efeitos. Por fim, cabe ressaltar que em todos os experimentos realizados no presente estudo, a administração das drogas fora do HD ou HV não resultaram

em alterações nas respostas comportamentais avaliadas. Juntos estes dados sustentam que o efeito ansiogênico encontrado no presente trabalho é decorrente da ação deste agonista nos receptores 5-HT1A locais e não da difusão para outras regiões.

Já em relação ao HV, observamos no experimento 2A que tanto a maior dose de 8-OH-DPAT (15 nmol), como a dose de serotonina testada (16 nmol), foram capazes de provocar um aumento do número de lambidas punidas no teste de beber punido de Vogel, sugerindo um efeito ansiolítico. Como no HD, a administração destas drogas não alterou o limiar de dor destes animais. Esses achados são compatíveis com a maioria dos trabalhos envolvendo lesões eletrolíticas, citotóxicas ou química desta região (BANNERMAN et al., 2003, TRIVERD; COVER, 2004, MCHUGH et al., 2004, WEEDEN et al., 2016). Por exemplo, Kjestrup e colaboradores (2002) mostraram que lesões neurotóxicas do HV com ácido ibotênico diminui a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado. Além disso, Li e colaboradores (2014), utilizando microdiálise, mostraram que o efeito ansiogênico promovida pela retirada do tratamento crônico com anfetaminas está associado a redução dos níveis de serotonina no HV. Na mesma direção, Fuss e colaboradores (2013), utilizando a técnica de *binding*, mostraram que o efeito ansiogênico promovido pela corrida voluntária crônica em uma roda de atividade (*long-term voluntary running*), está associado com a diminuição da função dos receptores 5-HT1A no HV. Ademais, nossos achados corroboram com os resultados encontrados por Kümpel e colaboradores (2016) em ratos expostos ao LTE. Esses pesquisadores demonstraram que a injeção de 8-OH-DPAT no HV, das doses 3 e 15 nmol, provocaram uma diminuição na latência das esquivas, um efeito ansiolítico, sem alterar a fuga, uma resposta defensiva que neste teste é associada ao pânico. O mesmo resultado também foi observado com a injeção intra-HV de midazolam, uma droga benzodiazepínica clássica usada no tratamento do TAG (KOBAYASHI et al., 2005; GEORGOPOULOS et al., 2008; GRAEFF, 2012).

No experimento 2B, foi possível observar que as injeções intra-HV das três doses de WAY-100635 provocaram uma diminuição no número de lambidas punidas (figura 4B), indicando um efeito ansiogênico e, portanto, oposto ao encontrado com a ativação dos receptores 5-HT_{1A} nesta região. Este resultado pode indicar que no HV a serotonina desempenha um papel tônico na modulação desses receptores, ao contrário do que acontece no HD, onde as mesmas doses de WAY-100635 não têm efeito, como relatado no LTE por Dos Santos e colaboradores (2008).

Em discordância com estes achados, Nunes-de-Souza e colaboradores (2002) mostraram que a injeção de WAY-100635 no HV levou a uma redução na ansiedade em camundongos submetidos ao LCE. No entanto, a dose efetiva utilizada por estes pesquisadores foi maior do que as utilizadas no presente estudo (5,55 nmol), o que poderia resultar em uma ação inespecífica da droga. Nesse sentido, sabe-se que o WAY-100635 também pode agir em receptores α ₁- adrenérgico e receptores dopaminérgicos do subtipo D₄ (CAO E RODGERS, 1996; CHEMEL E ROTH, 2006). Além disso, outra diferença entre os dois estudos é que as espécies de animais utilizadas foram distintas. Ainda, no caso do estudo com camundongos, não se verificou as consequências da estimulação local desses receptores, fazendo, por exemplo, injeções locais de 8-OH-DPAT.

Buscando confirmar se os efeitos observados no presente estudo com a injeção de serotonina ou 8-OH-DPAT no HV é derivado da ação destas drogas nos receptores 5-HT_{1A} ali presentes, realizamos o bloqueio farmacológico prévio destes receptores e observamos que tanto o efeito ansiolítico da serotonina como o do 8-OH-DPAT foi bloqueado por uma dose subeficaz de WAY-100635 (experimento 2C e 2D), confirmando o envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} nesses efeitos.

Outros grupos de pesquisa também buscaram investigar, de maneira mais sistemática, a participação de cada um dos polos hipocâmpais nos comportamentos de defesa relacionados a

ansiedade. Dentre eles, Zang e colaboradores (2014) mostraram que a inibição farmacológica temporária causada pela injeção de muscimol, um agonista de receptor GABA_A, em cada um dos polos hipocampais gerou respostas distintas no LCE. Enquanto no HV a injeção deste agonista causou supressão da locomoção, no HD os efeitos encontrados foram consistentes com um aumento na ansiedade. Nessa mesma direção, Mlinar e Corradetti (2018), em uma análise por eletrofisiologia, verificaram a modulação serotoninérgica ao longo do eixo dorsoventral do hipocampo. Estes pesquisadores observaram que após estímulo com MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina) e bloqueio da liberação de noradrenalina, a liberação seletiva de serotonina endógena no HD diminui a amplitude dos disparos neuronais, enquanto que no HV essa liberação aumenta a amplitude dos disparos. Este resultado indica que a serotonina endógena atua de maneira oposta ao agir no HD e HV, causando uma atenuação da neurotransmissão serotoninérgica no HD e uma facilitação da mesma no HV.

Ainda que o assunto não tenha sido suficientemente explorado, é possível que essa oposição de efeitos se dê em função da diferença na densidade e no padrão de inervação serotoninérgica observada entre estes polos. Isso porque o polo ventral apresenta uma densidade de fibras e níveis de serotonina maiores do que o polo dorsal (GAGE; THOMPSON, 1980; DEWAR et al., 1991; BJARKAM et al., 2003). Além disso, enquanto as inervações serotoninérgicas do NMR se estendem ao longo de todo eixo hipocampal, projeções do NDR, a partir principalmente do subnúcleo caudal, são limitadas ao HV (MUZERELLE et al., 2016).

Outra hipótese para explicar essa dualidade de efeitos decorrente da ativação de receptores 5-HT_{1A} no HD e no HV seria a de que, nas duas regiões, esses receptores integram uma microcircuitaria distinta, ou seja, eles estão expressos em neurônios de diferentes fenótipos. Ainda que as análises feitas nesse sentido não levem em questão a distinção entre os polos, evidências apontam que esses receptores no hipocampo podem estar presentes em neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e nitrérgicos (POMPEIANO et al., 1992, AZNAR et al., 2003,

ZANG et al., 2010). Com base nos nossos achados comportamentais, uma hipótese que se levanta é a de que no HD estes receptores estejam localizados em neurônios excitatórios, como os glutamatérgicos, enquanto no HV eles estejam em neurônios inibitórios, como os GABAérgicos, explicando assim a oposição de efeitos encontrados. Investigações futuras, utilizando-se de análises imunohistológicas, nos permitirão avaliar tal hipótese.

Um outro receptor presente no hipocampo e classicamente envolvido na fisiopatologia da ansiedade é o 5-HT_{2C} (ALVES et al., 2004; MILAN, 2005; SCARPELLI et al., 2008; VICENTE E ZANGROSSI, 2012; SANT'ANA et al., 2019; OHMURA et al., 2019). Alguns estudos mostram que, assim como ocorre com o 5-HT_{1A}, este receptor atua de maneira oposta dependente do polo hipocampal. Dessa maneira, enquanto no HD a ativação de 5-HT_{2C} diminui a ansiedade (SANT'ANA et al., 2019), no HV sua ativação aumenta a expressão de comportamentos associados a esta emoção (ALVES et al., 2004; SCARPELLI et al., 2008).

Levando esses dados a luz dos nossos achados, é concebível a hipótese de que a ação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} no hipocampo na mediação dos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade seja contrabalanceada. Assim, no HV a ativação dos receptores 5-HT_{1A} leva à ansiólise (experimento 2A), enquanto seu bloqueio gera efeitos ansiogênicos (experimento 2B), presumivelmente mediados pela ação da serotonina sobre os receptores 5-HT_{2C} nessa região. Já no HD, a ativação de receptores 5-HT_{1A} leva a um aumento na ansiedade (experimento 1A), enquanto a ativação de receptores 5-HT_{2C} leva a ansiólise (SANT'ANA et al., 2018).

Ainda que fique claro a participação de ambos os polos hipocampais nos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade, pouco se sabe sobre a valência de atuação de cada um destes polos frente aos estímulos aversivos. Alguns estudos recentes utilizando optogenética mostram uma participação maior do GD e CA1 do HV em relação ao HD nos comportamentos

defensivos em testes como o LCE e o campo aberto (JIMENEZ et al., 2018; KHEIRBEK et al., 2012). Ainda nesse sentido, Yoshida e colaboradores (2019) mostraram que a supressão da camada CA1 do HV, e não a do HD, é necessária para a manutenção do comportamento motivado, seja ele por recompensa ou punição. Desta maneira, eles sugerem que a supressão do HV causa a liberação da inibição comportamental permitindo a manutenção do comportamento motivado.

Estes trabalhos indicam a prevalência do HV no desencadeamento ou inibição dos comportamentos defensivos e atribuem ao HD a função de exploração e processamento das informações provenientes dos estímulos. De maneira oposta, nossos resultados farmacológicos assim como dados encontrados na literatura, fornecem fortes evidências da participação direta no HD na modulação dos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade (ROMANIUK et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2008; ALMADA et al., 2009; SANT'ANA et al., 2019). Assim, novos estudos que busquem avaliar a valência/primazia de cada um dos polos hipocâmpais frente a situações de conflito, e, portanto, relacionadas a ansiedade, poderão fornecer mais indícios acerca do funcionamento geral do sistema hipocâmpal na fisiopatologia da ansiedade.

Além da dualidade de efeito dos polos hipocâmpais, outro objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação dos receptores 5-HT_{1A} no mecanismo de ação dos antidepressivos. Nesse sentido, Sant'Ana (2017) mostrou que o efeito do tipo ansiogênico promovido pela administração aguda e sistêmica de fluoxetina e de imipramina é cancelado pela administração prévia de WAY-100635 no HD. Partindo desses resultados, investigamos se o tratamento crônico com estes antidepressivos em doses subefetivas, seria capaz de alterar o efeito ansiogênico causado pela administração de 8-OH-DPAT no HD.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento crônico com esses antidepressivos anulou o efeito ansiogênico do 8-OH-DPAT no HD, indicando que este tratamento sistêmico diminuiu a reatividade de receptores 5-HT_{1A} no HD. Isto pode decorrer, por exemplo, de uma diminuição na expressão e/ou na sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} nesta região. Porém, resultados prévios e da literatura parecem apontar para uma direção contrária a esta hipótese.

Neste sentido, em termos de sensibilidade, trabalhos mostram um aumento na sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} no HD após o tratamento crônico com antidepressivos. É o caso, por exemplo, de Castro e colaboradores (2003) que mostram que o uso crônico de fluoxetina (10 mg/kg/dia) provoca uma hipersensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} nas regiões de CA1 e DG no HD, como avaliado por eletrofisiologia. Resultado similar foi observado após o tratamento subcrônico de citalopram (20 mg/kg/dia) e escitalopram (10 mg/kg/dia) (EL MANSARI et al., 2005). Estes pesquisadores, através de eletrofisiologia, mostraram que, após tratamento por duas semanas com estes antidepressivos, a administração de WAY-100635 (20-100 ug/kg, i.v) aumentou de maneira dose dependente o disparo neuronal da camada CA3 do HD, indicando um aumento na ativação tônica dos receptores 5-HT_{1A} nesta região (EL MANSARI et al., 2005). Além disso, Moulin-Sallon e colaboradores (2009), através da técnica de *binding*, mostraram que o tratamento crônico com citalopram (10 mg/kg/dia) causou um aumento na sensibilidade funcional dos receptores 5-HT_{1A} no HD, uma vez que após o tratamento crônico o estímulo com 8-OH-DPAT provocou um aumento de ativação da proteína G no HD. No entanto, dados conflitantes também são encontrados na literatura. Por exemplo, Hensler (2002) mostra que o tratamento subcrônico (14 dias) com fluoxetina (10 mg/kg/ dia) não foi capaz de alterar a capacidade de ativação da proteína G pelos receptores 5-HT_{1A} do HD, medido através de estudos de *binding*.

Diante de tais achados, acreditamos que outros estudos se fazem necessários para investigar os efeitos das drogas antidepressivas sobre a reatividade de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo.

Por exemplo, análises por *western blotting* poderão fornecer indícios se o tratamento de longo prazo com os antidepressivos altera de maneira diferenciada a expressão de receptores 5-HT_{1A} nestes dois polos hipocâmpais.

Conclusão

6. Conclusão

Os resultados do presente trabalho confirmam a participação do hipocampo como estrutura criticamente envolvida nos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Mais do que isso, os resultados sugerem que os receptores 5-HT_{1A} no HD e no HV desempenham papéis opostos no processamento da ansiedade, e que o tratamento crônico com antidepressivos diminui a resposta modulada por este receptor no HD.

Referências Bibliográficas

7. Referências:

- ABELA, A.R., BROWNE, C.J., SARGIN, D., PREVOT, T.D., JI, X.D., LI, Z., LAMBE, E.K., FLETCHER, P.J., Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*, 168: 107985-108021, maio 2020.
- ABRAMOWSKI, D.; RIGO, M.; DUC, D.; HOYER, D.; STAUFENBIEL, M. Localization of the 5-Hydroxytryptamine 2C Receptor Protein in Human and Rat Brain Using an Specific Antisera. *Neuropharmacology*, 34(12):1635-1645, 1995
- ALMADA, R.C., BORELLI, K.G., ALBRECHET-SOUZA, L. BRANDÃO, M.L. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res* 203(2):279-287, 2009.
- ALVES, S.H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A.P. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT (2C) agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol*, 15: 37-43, 2004.
- AMARAL, D.; LAVENEX, P. Hippocampal neuroanatomy. In: ANDERSEN P.; MORRIS, R.; AMARAL D.; BLISS T.; O'KEEFE, J. (Ed.). *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press; 2007. p. 37-114.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th edition, text revision. Washington, DC, 2013.
- ANDERSEN, P.; BLISS, T.V.P.; SKREDE, K.K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res*. 13:222–238, 1971.
- ANDREWS, N., HOGG, S., GONZALEZ, L.E., FILE, S.E. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. *Eur J Pharmacol* 264:259–64, 1994.
- AZNAR, S.; QIAN, Z.; SHAH, R.; RAHBEEK, B.; KNUDSEN, G.M. The 5-HT_{1A} serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Res*. 959(1):58-67, 2003.
- BANNERMAN, D.M.; GRUBB, M.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; FELDON, J.; RAWLINS, J.N.P. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 139: 197–213, 2003.
- BANNERMAN; D.M., RAWLINS; J.N.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.; YEE, B.K.; BAST; T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28, 273–283. Review. 2004.
- BASSI, G.S., CARVALHO, M.C., ALMADA, R.C., BRANDÃO, M.L. Inhibition of substance P induced defensive behavior via neurokinin-1 receptor antagonism in the central and medial but not basolateral nuclei of the amygdala in male Wistar rats. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 77, 146–154, 2017.
- BAXTER, A. J.; VOS, T.; SCOTT, K. M.; FERRARI, A.J.; WHITEFORD, H.A. The global burden of anxiety disorders in 2010. *Psychological Medicine*, 1-12, 2014.

- BEREZA, B.G.; MACHADO, M.; EINARSON, T.R. Systematic review and quality assessment of economic evaluations and quality-of-life studies related to generalized anxiety disorder. *Clin Ther*, 31(6): 1279-308, 2009.
- BERUMEN Serotonin Receptors in Hippocampus. *Scientific World Journal*, 2012:82349, 2012.
- BJARKAM, C. R.; SORENSEN, J. C.; GENESER, F. A. Distribution and morphology of serotonin-immunoreactive axons in the hippocampal region of the New Zealand white rabbit. I. Area dentata and hippocampus. *Hippocampus*, 13 (1): 21-37, 28 out. 2003.
- BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol*, 100:101-107, 1986.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, 39: 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, 58: 155-165, 1993.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; POBBE R.; BLANCHARD, R.J. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(4):991-998, 2011.
- BLANCHARD, C.D.; MEYZA, K. Risk assessment and serotonin: Animal models and human psychopathologies. *Behavioural Brain Research*, 357-358, p.9-17, jan. 2019.
- BLIER, P.; ABBOTT, F.V. Putative mechanisms of action of antidepressant drugs in affective and anxiety disorders and pain. *J. Psychiatry Neurosci*, 26:37-43, 2001.
- BLIER, P.; EL MANSARI, M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 368 (1615): 20120536-20120543, 5 abr. 2013.
- CAO, B.J.; RODGERS, R.J. Different behavioural profiles of R-(1)-and S-(2)-enantiomers of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) in the murine elevated plus maze, *Behav. Pharmacol*, 7: 810-819, 1996.
- CASTRO, M. E., DIAS, A. del OLMO, E., PAZOS, A. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Neuropharmacol*, 44 (1): 93-101, jan. 2003.
- CHAPUT Y.; DE MONTIGNY C.; BLIER P. Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments: an in vivo electrophysiologic study in the rat. *Neuropsychopharmacol* 5:219-229, 1991.
- CHEETA, S., KENNY, P.J., FILE, S.E. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24(7):1053-1067, 2000.
- CHEMEL, B. R.; ROTH, B. L.; ARMBRUSTER, B.; WATTS, V. J.; NICHOLS, D. E. WAY-100635 is a potent dopamine D₄ receptor agonist. *Psychopharmacol*, 188 (2): 244-251, 17 ago. 2006.

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

DALE, E.; PEHRSON, A.L.; JEYARAJAH, T.; LI, Y.; LEISER, S.C.; SMAGIN G.; OLSEN, C.K.; SANCHEZ, C. Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectr*. 21(2):143-61, 2016.

DARWIN, C.A. A expressão das emoções nos homens e nos animais. Tradução GARCIA, L.S.L. companhia das letras, São Paulo, 2000.

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

DEWAR, K. M.; READER, T. A.; GRONDIN, L.; DESCARRIES, L. [3H]Paroxetine binding and serotonin content of rat and rabbit cortical areas, hippocampus, neostriatum, ventral mesencephalic tegmentum, and midbrain raphe nuclei region. *Synapse*, 9 (1):14-26, set. 1991.

DOLORFO, C.L.; AMARAL, D.G. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol*, 398(1):49-82, 1998.

DOS SANTOS, L.; ANDRADE, G.C.S.; ZANGROSSI, H.JR. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median nucleus. *Euro Neuropsychopharmacol*, 18:286-294, 2008.

DREMENCOV, E.; GUR, E.; LERER, B.; NEWMAN, M.E. Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(5):729-739, 2003.

EL MANSARI, M. SÁNCHEZ, C.; CHOUVET, G. RENAUD, B.; HADDJERI, N. Effects of Acute and Long-Term Administration of Escitalopram and Citalopram on Serotonin Neurotransmission: an In Vivo Electrophysiological Study in Rat Brain. *Neuropsychopharmacol*, 30 (7): 1269-1277, 9 fev. 2005.

FANSELOW, M.S.; DONG H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1):7-19, 2009.

File, S.E., Gonzalez, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 54(1):123–128, 1996.

FUSS, J.; VOGT, M. A.; WEBER, K.; BURKE, T. F.; GASS, P.; HENSLER, J. G. Hippocampal serotonin-1A receptor function in a mouse model of anxiety induced by long-term voluntary wheel running. *Synapse*, 67 (10): 648-655, 18 abr. 2013.

GAGE, F. H.; THOMPSON, R. G. Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorsal-ventral axis of the hippocampal formation. *Brain Research Bulletin*, 5 (6): 771-773, nov. 1980.

GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of “conflict” behavior. *Eur J Pharmacol*., 9(3): 319-24, 1970.

GELLER, I.; SEIFER, J. The effects of meprobamate barbiturates, D-amphetamine, and promazine on experimentally induced conflict in the rat, *Psychopharmacol*. 482-492, 1960.

- GEORGOPOULOS, P.; PETRIDES, T.; KOSTOPOULOS G.; PAPATHEODOROPOULOS, C. Varying magnitude of GABAergic recurrent inhibition enhancement by different sedative/anesthetic agents in dorsal and ventral hippocampus. *Brain Research*, 207: 43–59, 2008.
- GORDON, J.A.; HEN, R. The serotonergic system and anxiety. *NeuroMolecular Med.* 5:27-40, 2004.
- GRAEFF, F.G.; SCHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther*, 173(2): 277-83, 1970.
- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense system. *Braz J Med Biol Res*, 14:239-265, 1981.
- GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 27: 811–829, 1994
- GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF F.G.; BRANDÃO M.L. (Ed). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5.ed. São Paulo: Lemos, p.135-178, 1999.
- GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163:467-76, 2002.
- GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. Jr. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 10(3): 207-217, 2010.
- GRAEFF, F.G. Medicamentos antiansiedade. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. *Fundamentos da Psicofarmacologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu. p. 165-204, 2012.
- GRAY, J. A. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press, 1982.
- GRIEBEL G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther*, 65(3):319-395. Review. 1995.
- GUIMARÃES, F.S., DEL BEL, E.A, PADOVAN, C.M., MENDONÇA NETTO, S. TITZE DE ALMEIDA, R. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behavioural Brain Research*. 58:133-139, 1993.
- GUIMARÃES, F.S.; ZANGROSSI, H. JR.; DEL BEN C.M.; CAPÍTULO 4.9 - Serotonin in Panic and Anxiety Disorders. In: Christian Müller & Barry Jacobs (Eds.): MULLER, C.P.; JACOBS, B.L. (Ed.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*, San Diego: Elsevier, p 667–685, 2010.
- HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*, 195(1):198-213, 2008.
- HENSLER, J.G. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*, 30(2):203-214, 2006.
- HJORTH, S.; BENGTSSON, H.J.; KULLBERG, A.; CARLZON, D.; PEILOT, H.; AUERBACH SB. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *J Psychopharmacol* 14(2):177-185, 2000.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4):533-554. Review. 2002.

IMAI, H.; STEINDLER, D.A.; KITAI, S.T. The Organization of Divergent Axonal Projections From the Midbrain Raphe Nuclei in the Rat. *The Journal Of Comparative Neurology*, 243: 363-380, 16 set. 1986.

JIMENEZ, J.C.; SU, K.; GOLDBERG, A. R.; LUNA, V. M.; BIANE, J. S.; ORDEK, G.; ZHOU, P.; ONG, S.K.; WRIGHT, M. A.; ZWEIFEL, L. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*, 97 (3): 670-683, fev. 2018.

JOLAS, T., SCHREIBER, R., LAPORTE, A.M., CHASTANET, M., DEVRY, J., GLASER, T., ADRIEN, J., HAMOM, M. Are postsynaptic 5-HT_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 272:920-9, 1995.

KATAOKA, T.; SHIBATA, K.; MIYAZAKI, A.; INOUE, Y.; TOMINAGA, K.; KOIZUMI, S.; UEKI, S.; NIWA, M. Involvement of the dorsal hippocampus in mediation of the antianxiety action of tandospirone, a 5-hydroxytryptamine, 1A agonistic anxiolytic. *Neuropharmacology*, 30 (5) 475-480, 27 set. 1990.

KHEIRBEK, M. A.; DREW, L. J.; BURGHARDT, N. S.; COSTANTINI, D. O.; TANNENHOLZ, L.; AHMARI, S. E.; ZENG, H.; FENTON, A. A.; HEN, R. Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 77 (5): 955-968, mar. 2013.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology & Behavior*, 15(1): 47-53, 1975.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M.; GERMAN, D. C. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Research*, 155(2): 331-342, 1978.

KJELSTRUP, K.G., TUVNES, F.A., STEFFENACH, H.A., MURISON, R., MOSER, E.L., MOSER, M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci*, 9:10825-10830, 2002.

KOBAYASHI, S.; FUJITO, Y.; MATSUYAMA, K.; AOKI, M. Synaptic Transmission Comparison of midazolam effects on inhibitory postsynaptic currents in hippocampal CA3 with those in CA1. *Euroreport*, 16 (9): 1003-1007, 2005.

KUMPEL, V. D.; Envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo ventral na regulação de comportamento defensivos relacionados com a ansiedade generalizada e com o pânico. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista, Assis, 2016.

LI, H.; SCHOLL, J. L.; TU, W.; HASSELL, J. E.; WATT, M. J.; FORSTER, G. L.; RENNER, K. J. Serotonergic responses to stress are enhanced in the central amygdala and inhibited in the ventral hippocampus during amphetamine withdrawal. *European Journal Of Neuroscience*, 40 (11): 3684-3692, 19 set. 2014.

MCHUGH, S.B., DEACON, R.M.J., RAWLINS, J.N.P., BANNERMAN, D.M. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118:63-78, 2004.

- MCKENNA, J.T.; VERTES, R.P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Research Bulletin*, 54 (6): 619- 630, 2001.
- MCNAUGHTON N.; GRAY, J.A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*, 61(3): 161-176, 2000.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28(3) 285-305, 2004.
- MENARD, J., TREIT, D. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behav Pharmacol* 9:93–101, 1998.
- MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress In Neurobiology*. 70 (2): 83-244, jun. 2003.
- MILLAN, M.J. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Pharmacol*, 60: 441-460, 2005.
- MLINAR, B.; CORRADETTI, R. Differential modulation of CA1 impulse flow by endogenous serotonin along the hippocampal longitudinal axis. *Hippocampus*, 28 (3): 217-225, 10 jan. 2018.
- MOLLIVER, M.E. “Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function”, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 7(6):3S-23S, 1987.
- MOSER, M.B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8:608-619, 1998.
- MOULIN-SALLANON, M. et al. Acute and chronic effects of citalopram on 5-HT_{1A} receptor-Labeling by [18F]MPPF and-Coupling to receptors-G proteins. *Synapse*, 63(2): 106-116, 18 nov. 2008.
- MUZERELLE, A.; LOMASSESE, S.S.; BERNARD, J.F.; SOIZA-REILLY, M.; GASPAR, P. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Structure And Function*, 221(1): 535-561, 18 nov. 2016
- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J. Effects of intrahippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of sit of injection and prior test experience. *Brain Research*, 927 (1): 87–96, 2002.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Oxford University Press, 1978. p 570.
- OHMURA, Y., TSUTSUI-KIMURA, I., SASAMORI, H., NEBUKA, M., NISHITANI, N., TANAKA, K.F., YAMANAKA, A., YOSHIOKA, M., Different roles of distinct serotonergic pathways in anxietylike behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*, 2019.
- PANKSEPP, J. Psychobiological of emotions. *Behavioral And Brain Science*, 5: 407-467, mar. 1982.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed., San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.

- PREZEGALINSKI, E.; TATARCZYNSKA, E.; KLODZINSKA, A.; CHOJNACKA-WOJCIK, E. The role of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the anticonflict effect of Ipsapirone. *Neuropharmacology*, 33 (9): 1109-1115, 1 jun. 1994.
- POMPEIANO, M.; PALACIO, J.M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci*, 12(2):440-53, 1992.
- ROBICHAUD, R.C.; SLEDGE, K.L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life Sci*, 8(17): 965-9, 1969
- ROMANIUK, A., KOPROWSKA, M., KROTEWICZ, M., STRZELCZUK, M., WIECZOREK, M. Effects of 8-OHDPAT administration into the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus on fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats, *Behav Brain Res* 120(1):47-57, 2001.
- SAMUELS, B.A., MENDEZ-DAVID, I.; FAYE, C.; DAVID, S.A.; PIERZ, K.A.; GARDIER, A.M.; HEN, R.; DAVID, D.J. Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. *Neuroscientist*, 22(1):26-45, 2016.
- SANT'ANA, A. B. Envolvimento dos receptores dos tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal na mediação dos efeitos de drogas antidepressivas na ansiedade. 2017. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Usp, Ribeirão Preto, 2017.
- SANT'ANA, A. B.; VILELA-COSTA, H. H.; VICENTE, M. A.; HERNANDES, P. M.; ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI, H. Role of 5-HT_{2C} receptors of the dorsal hippocampus in the modulation of anxiety- and panic-related defensive responses in rats. *Neuropharmacology*, 148: 311-319, abr. 2019.
- SCARPELLI, G.; ALVES, S. H.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. M. Effects of two selective 5-HT_{2C} receptor-acting compounds into the ventral hippocampus of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 1 (1): 87-95, jan. 2008.
- SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of periaqueductal gray substance in the anti-anxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 9(3): 287-295, 1978.
- SCHREIBER, R., DE VRY, J. Neuronal circuits involved in the anxiolytic effects of the 5-HT_{1A} receptor agonists 8-OH-DPAT ipsapirone and buspirone in the rat. *Eur J Pharmacol* 249(3):341-51, 1993.
- SHUHAMA, R.; DEL-BEN, C.M.; LOUREIRO, S.R.; GRAEFF, F.G. Animal defense strategies and anxiety disorders. *An Acad Bras Cienc*, 79(1):97-109, 2007.
- TANAKA, K.F.; SAMUELS, B.A.; HEN, R. Serotonin receptor expression along the dorsal-ventral axis of mouse hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 367(2): 395-240, 2012.
- TESAR, G.E.; ROSENBAUM, J.F. Recognition and management of panic disorder. *Adv Intern Med*, 38:123-49. Review. 1993.
- THOMAS, D.R., GITTINS, S.A., COLLIN, L.L., MIDDLEMISS, D.N., RILEY, G., HAGAN, J., GLOGER, I., ELLIS, C.E., FORBES, I.T., BROWN, A.M. Functional characterisation of

the human cloned 5-HT₇ receptor (long form); antagonist profile of SB-258719. *Br. J. Pharmacol.* 124 (6), 1300–1306, 1998.

TRIVEDI, M.A.; COOVER, G.D. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81:172–184, 2004.

VICENTE, M.A.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14:1-12, 2012.

WEEDEN, C.S.S.; ROBERTS, J.M.; KAMM, A.M; KESNER, R.P. The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 118:143-149, 2016.

WEST, M.J. Stereological studies of the hippocampus: a comparison of the hippocampal subdivisions of diverse species including hedgehogs, laboratory rodents, wild mice and men. *Prog Brain Res*, 83:13-36, 1990.

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

WITTER, M.P. Hippocampus and Related Structures. In: SMELSER, N.J.; BALTES, P.B. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*. 6711-6718, 2001.

YONKERS, K.A.; ZLOTNICK, C.; ALLSWORTH J.; WARSHAW, M.; SHEA, T.; KELLER, M.B. Is the course of panic disorders the same in woman and men? *Am J Psychiatry*, 155(5): 596-602, 1998.

YOSHIDA, K.; DREW, M. R.; MIMURA, M.; TANAKA, K. F. Serotonin-mediated inhibition of ventral hippocampus is required for sustained goal-directed behavior. *Nature Neuroscience*, 22 (5): 770-777, 15 abr. 2019.

ZANGROSSI, H.JR.; GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Ateneu, p 55-73, 2004.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 46: 397-406, out. 2014.

ZHANG, J.; HUANG, X.; YE, M.L.; LUO, C.X.; WU, H.Y.; HU, Y.; ZHOU, Q.G.; WU, D. L.; ZHU, L.J.; ZHU, D.Y. Neuronal Nitric Oxide Synthase Alteration Accounts for the Role of 5-HT_{1A} Receptor in Modulating Anxiety-Related Behaviors. *Journal Of Neuroscience*, 30 (7): 2433-2441, 17 fev. 2010.

ZHANG, W.-N.; BAST, T.; XU, Y.; FELDON, J. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, 262: 47–56, 2014.

Anexo

8. Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Estudo do papel da neurotransmissão serotoninérgica nas porções dorsal e ventral do hipocampo na mediação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade*”, registrado com o número **188/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Helio Zangrossi Junior**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de abril de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 320 ratos Wistar-OLD machos pesando 250g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/04/2019 a 01/08/2021.

We certify that the Protocol nº 188/2018, entitled “*The role of serotonergic neurotransmission in the dorsal and ventral hippocampus in the mediation of defensive behavior related to anxiety*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/29/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 320 male Wistar-Old rats weighing 250g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 08/01/2021.

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP