UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Participação dos receptores do subtipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal de
ratos na ansiedade experimental

Ana Beatriz Sant' Ana do Nascimento

Ribeirão Preto
2012

Ana Beatriz Sant' Ana do Nascimento

Participação dos receptores do subtipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal de ratos na ansiedade experimental

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

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior

**Ribeirão Preto
2012**

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

Sant' Ana, Ana Beatriz do Nascimento

Participação dos receptores do subtipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal de ratos na ansiedade experimental. Ribeirão Preto, 2012.

81 p.il.

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

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Ansiedade. 2. Serotonina. 3. Hipocampo dorsal. 4.Receptores 5-HT_{2C}. 5. Labirinto em T elevado

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Beatriz Sant' Ana do Nascimento

Participação dos receptores do subtipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal de ratos na ansiedade experimental

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

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FCFRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Leandro José Bertóglio

Instituição: CCB – UFSC

Assinatura _____

À toda minha família, aos meus pais e mães. Em especial, à minha amada mãe **Roseli**, meu exemplo de fé, força, e determinação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior pela oportunidade, ensinamentos e constante suporte na realização deste trabalho

À Prof. Dra Telma Carneiro Spera de Andrade pelos constantes ensinamentos e por acompanhar e incentivar os primeiros passos que me trouxeram até aqui.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca e Prof. Dr. Leandro José Bertoglio por aceitarem o convite, pela prontidão e disponibilidade, e pelas enriquecedoras sugestões e discussões

Aos funcionários da CPG da FMRP e aos docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia. Agradeço em especial a Sônia Maria Stefanelli de Andrade, Fátima Helena Petean, José Waldick Ramon e Tadeu Franco Vieira pela paciência e apoio.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Afonso de Paula Padovan pelo suporte técnico, amizade e por tornar os dias de trabalho mais leves

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Comportamento: Ailton Spiacci Júnior, Maria Adrielle Vicente, Melina Matthiesen, Thathiane de Oliveira Sérgio e Paula Shimene de Melo Yamashita E aos que já pertenceram ao grupo, Plínio Cabrera Casarotto e Valquíria de Bortoli. Agradeço pelas contribuições diretas e indiretas.

Em especial à Maria Adrielle Vicente, colaboradora do presente trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e amizade. Sem suas contribuições a concretização desse trabalho não seria possível.

À toda minha família, por compreender minha ausência., pelas orações e pelo apoio incondicional. Agradeço a cada um de vocês, que contribuíram para minha formação moral e acadêmica

Ao Guilherme Ferreira Caetano pela paciência, zelo e amor. Agradeço por cada refeição, carona, louça-lavada, e mercados na minha ausência. Obrigada por me aguentar e me incentivar sempre.

Finalmente e principalmente, agradeço a Deus pelas bênçãos que tem derramado sobre minha vida. Que cada conquista minha seja para a glória do seu nome.

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

RESUMO

Sant' Ana, Ana Beatriz do Nascimento. **Participação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal de ratos na ansiedade experimental.** 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Estudos com microinjeções de drogas vêm sendo realizados na tentativa de se compreender a participação da neurotransmissão serotoninérgica do hipocampo na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Nesse sentido, observou-se que a ativação dos receptores do tipo 5-HT_{1A} do hipocampo dorsal (HD) promoveu efeito do tipo ansiogênico sobre a resposta de esquiva inibitória, sem alterar a resposta de fuga, em ratos submetidos ao labirinto em T elevado (LTE). Essa alteração seletiva na resposta de esquiva inibitória sustenta a hipótese da participação do hipocampo na fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada, uma vez que, as respostas defensivas de esquiva inibitória e fuga, expressas no LTE, têm sido relacionadas respectivamente ao transtorno de ansiedade generalizada e ao transtorno do pânico. Além de receptores do tipo 5-HT_{1A}, destaca-se no HD a presença de receptores do tipo 5-HT_{2C}. Tem sido observado que a estimulação desses últimos em áreas límbicas associadas à ansiedade, como a amígdala, promove efeito do tipo ansiogênico em diferentes modelos animais de ansiedade. Porém, ainda é desconhecida a participação desses receptores presentes no HD sobre as respostas de esquiva inibitória e fuga, geradas no LTE. Assim, o presente estudo procurou avaliar a participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade generalizada e ao transtorno do pânico. Os resultados mostram que injeções bilaterais intra-HD dos agonistas de receptores 5-HT_{2C} MK-212 ou RO-600175 prejudicaram a aquisição da resposta de esquiva inibitória, em ratos testados no LTE, indicando um efeito do tipo ansiolítico. Por outro lado, a administração do antagonista de receptores 5-HT_{2C} SB-242084 promoveu efeito oposto sobre essa mesma resposta. Adicionalmente administração do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A} DOI não foi capaz de promover efeito em nenhuma das doses utilizadas. Nenhum dos tratamentos empregados alterou a resposta de fuga no LTE. O efeito ansiolítico da ativação dos receptores 5-HT_{2C}, bem como o efeito ansiogênico resultante do seu bloqueio, foram confirmados no teste do beber punido de Vogel. Em suma, nossos resultados sugerem que os receptores do tipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal estão envolvidos na modulação de comportamentos defensivos relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada, mas não ao transtorno do pânico.

ABSTRACT

Sant' Ana, Ana Beatriz do Nascimento. **Involvement of 5-HT_{2C} receptors of the dorsal hippocampus on anxiety-related defensive responses.** 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Studies using intracerebral microinfusion of drugs have been performed to unveil the role of the hippocampus serotonergic system in the modulation of anxiety-related defensive behaviors. For instance, it has been shown that activation of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus (DH) facilitated inhibitory avoidance acquisition, suggesting an anxiogenic effect, without altering escape expression in rats tested in the elevated T-maze (ETM). This selective effect on inhibitory avoidance response is consistent with the notion that the hippocampus is critically involved in the pathophysiology of generalized anxiety disorder. Besides 5-HT_{1A} receptors, expressive levels of 5-HT_{2C} receptors are also reported in hippocampus. Compelling evidence from animal studies shows that facilitation of 5-HT_{2C} receptor-mediated neurotransmission increases anxiety. In this study we evaluated the involvement the 5-HT_{2C} receptors of the DH in the regulation of defensive behaviors that have been associated with generalized anxiety and panic. Male Wistar rats were tested in the ETM after intra-DH injection of the 5-HT_{2C} receptor agonists MK-212, RO-600175, or the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI, or the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084. For comparative reason, the effect of MK-212, RO-600175 and SB-242084 was also evaluated on another generalized anxiety-associated model, the Vogel conflict test. Our results showed that while intra-DH microinjection of both MK-212 and RO-600175 facilitated inhibitory avoidance acquisition, suggesting an anxiolytic effect, SB-242084 had the opposite effect. Injections of DOI did not affected performance in ETM. None of these drugs affected escape performance in the ETM. The anxiolytic-like effects of the 5-HT_{2C} receptor agonists and anxiogenic-like effect of the SB-242084 were also observed in the Vogel conflict test. Our findings indicate that 5-HT_{2C} receptors in DH are selectively involved in the regulation of defensive behaviors associated with generalized anxiety, but not panic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Ansiedade e reações de defesa.....</i>	12
1.2. <i>Substratos neurais das reações de defesa relacionadas à ansiedade</i>	16
1.3. <i>Hipocampo - diferenciação anatomo-funcional</i>	18
1.4. <i>Serotonina, ansiedade e o hipocampo dorsal</i>	21
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. <i>Objetivo geral</i>	28
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. <i>Animais</i>	30
3.2. <i>Drogas</i>	30
3.3. <i>Aparatos.....</i>	31
3.3.1. <i>Labirinto em T elevado</i>	31
3.3.2. <i>Campo aberto</i>	32
3.3.3. <i>Teste do beber punido de Vogel e teste de consumo de água.....</i>	33
3.4. <i>Procedimentos</i>	34
3.4.1. <i>Procedimento cirúrgico</i>	34
3.4.2. <i>Injeções intra-hipocampo dorsal</i>	35
3.4.3. <i>Testes comportamentais.....</i>	36
3.4.3.1. <i>Avaliação no Labirinto em T elevado e teste do campo aberto</i>	36
3.4.3.2. <i>Avaliação no teste do beber punido de Vogel</i>	39
3.4.3.3. <i>Teste de consumo de água</i>	40
3.5. <i>Perfusão.....</i>	41
3.6. <i>Histologia</i>	41
3.7. <i>Análise estatística dos resultados.....</i>	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. <i>Análise histológica</i>	44
4.2. <i>Experimento 1</i>	45
4.3. <i>Experimento 2.....</i>	48
4.4. <i>Experimento 3.....</i>	51

4.5. Experimento 4	54
4.6. Experimento 5	57
4.7. Experimento 6	58
4.8. Experimento 7	59
4.9. Experimento 8	60
4.10. Experimento 9	61
4.11 Experimento 10	62
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade e reações de defesa

A ansiedade é um estado emocional caracterizado por alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivas, que resultam em uma experiência subjetiva não prazerosa e desconfortável. Até um determinado nível, a ansiedade, assim como emoções relacionadas, tem grande valor adaptativo, favorecendo a motivação e o desempenho do indivíduo. Por outro lado, pode tornar-se patológica quando manifestada em níveis exacerbados, que ao contrário, prejudicam o funcionamento normal do indivíduo (GRAEFF, 1999).

Diferentes sintomas, decursos temporais e respostas terapêuticas estão relacionados à ansiedade patológica primária, logo, fez-se necessária sua classificação em diferentes transtornos de ansiedade. De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2004), os transtornos de ansiedade podem ser classificados em: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico com ou sem agorafobia, agorafobia sem histórico de transtorno do pânico, fobia específica, ansiedade social, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, transtorno de ansiedade induzido por substâncias químicas e transtorno atípico de ansiedade.

O desenvolvimento da pesquisa, tanto clínica quanto experimental, tem agregado conhecimentos relacionados a esses diferentes transtornos. Em especial, a experimentação animal tem promovido avanços no campo da farmacoterapia dos

diferentes transtornos de ansiedade e contribuído substancialmente para o entendimento de suas bases fisiopatológicas (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

A utilização de modelos animais no estudo sistemático da ansiedade baseia-se na abordagem evolutiva originalmente proposta por Darwin em seu livro *A expressão das emoções nos homens e nos animais* (1872). Segundo Darwin, há uma relação filogenética entre as emoções observadas em humanos e as respostas comportamentais de outros animais. Assim, de acordo com essa abordagem, a ansiedade e emoções relacionadas, como o medo, teriam suas raízes biológicas nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representem perigo ou ameaça a sobrevivência (GRAEFF, 1999).

Nos últimos anos, propostas têm sido feitas associando reações específicas de defesa à ansiedade e ao medo, dando suporte ao estudo experimental dos diferentes transtornos de ansiedade (BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; SHUHAMA et al., 2008).

Nesse sentido, destacam-se os trabalhos conduzidos pelo casal Blanchard que investigou, em ambiente controlado, o comportamento defensivo de ratos selvagens frente a estímulos de ameaça predatória. Os resultados obtidos nesta abordagem etoexperimental, levaram a concepção de níveis de defesa, caracterizados por estratégias defensivas distintas, que por sua vez, são determinadas por diferentes níveis de ameaça predatória, a saber: potencial, distal e proximal (BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 1989; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003).

O primeiro nível de ameaça ocorre, por exemplo, quando o animal se encontra em um local onde, embora o predador esteja ausente, a detecção de sua presença no passado, caracteriza a incerteza da existência do perigo. Em reação a

esta ameaça potencial, o animal apresenta um padrão de respostas marcado pela exploração cautelosa, com tentativas de aproximação seguidas de esquiva da fonte de ameaça, denominado avaliação de risco, que visa à avaliação da probabilidade de perigo. Durante sua execução, comportamentos não defensivos, como repouso, exploração e auto-limpeza são inibidos (BLANCHARD et al., 1998; SHUHAMA et al., 2007). O grau de supressão desses comportamentos pode ser utilizado como medida indireta de defensividade, que estaria relacionada à ansiedade (SHUHAMA et al., 2007).

Já no nível distal, a presença do predador é real, mas a uma distância segura da presa. Caso exista uma rota de saída, a resposta de fuga é preferencialmente selecionada. Esta resposta de fuga direcionada estaria relacionada ao medo (GRAEFF, 1994). Porém quando esta não é viável, a presa permanece imóvel (congelamento), dificultando sua detecção pelo predador. Estudos experimentais, em ambientes que não permitem a fuga, utilizam a resposta de congelamento como um índice também associado ao medo (SHUHAMA et al., 2007).

Por fim, o terceiro nível (proximal), ocorre quando o predador está muito próximo, ou já em contato com a presa. Nessa situação, ocorrem tentativas explosivas de fuga, ou o ainda ataque defensivo. Respostas evocadas nesse nível de ameaça estariam ligadas a uma condição de medo intenso. (GRAEFF, 1994; SHUHAMA et al., 2007).

Em linhas gerais, de acordo com esta abordagem focada na distância defensiva, a distinção entre ansiedade e medo estaria relacionada à potencialidade de ocorrência do ataque predatório (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989).

Valendo-se de estudos utilizando modelos animais de condicionamento, Gray e McNaughton (2000), além de incluírem no primeiro nível de ameaça, estímulos

condicionados que sinalizam punição ou frustração, ampliaram a visão desta distinção (ansiedade *versus* medo), somando à concepção de distância defensiva a noção de direção defensiva, que traz o conflito entre aproximação e esquiva como essencial para caracterização da ansiedade. Deste modo, frente a uma situação de conflito, quando há uma tendência de aproximação da fonte de perigo, como, por exemplo, ocorre no comportamento de avaliação de risco, existe ansiedade. Porém, quando a fonte de ameaça é real e pode ser evitada ou eliminada pela fuga, não existe conflito nem ansiedade, mas somente medo.

Em suma, a ansiedade controla comportamentos que colocariam o animal em uma situação de risco, enquanto o medo controla comportamentos que permitem que o animal saia da situação de risco (MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

Com base nas concepções descritas acima, experimentos de validação farmacológica foram conduzidos, a fim de se estabelecer uma relação entre os níveis de defesa e os diferentes transtornos de ansiedade. Mais especificamente, estes estudos sustentam a relação entre as respostas de avaliação de risco e esquiva inibitória e o transtorno de ansiedade generalizada, e a resposta de fuga e o transtorno do pânico (para revisão ver BLANCHARD et al., 2011).

1.2. Substratos neurais das reações de defesa relacionadas à ansiedade

Embora os modelos animais não tenham como contribuir para o entendimento das bases neurais do componente subjetivo da ansiedade, sua utilização permitiu identificar estruturas envolvidas na mediação de outros aspectos desta emoção, como os comportamentais e autonômicos (GRAEFF; HETEM, 2004).

Com base nesses estudos, foram formuladas várias proposições teóricas na tentativa de sistematizar as informações disponíveis sobre as bases neuroanatômicas dos comportamentos de defesa, destacando-se a elaboração de dois sistemas (GRAEFF; HETEM, 2004).

O primeiro, o sistema cerebral de defesa (SCD) foi caracterizado com base em estudos neurofisiológicos. Nesse sistema, estruturas cerebrais como o hipotálamo medial, a substância cinzenta periaquedutal dorsal e a amígdala representariam o substrato neural para expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos ou dolorosos (GRAEFF, 1981).

Faz-se de maior relevância para o presente trabalho, um segundo constructo teórico, o denominado sistema de inibição comportamental (SIC), derivado da psicologia experimental (GRAY, 1982; GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

O sistema septo-hipocampal (SSH) destaca-se como estrutura chave dessa teoria. Lesões dessas estruturas, de maneira combinada, ou separadamente induzem efeitos comportamentais que se assemelham aos produzidos por drogas ansiolíticas. Sendo assim, tais drogas determinariam seus efeitos por prejudicarem o funcionamento do SIC (MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

De acordo com essa proposição, a ansiedade seria resultante da ativação do SIC por determinados estímulos ambientais, tais como, sinais de punição ou

frustração, estímulos de medo inato e situações ou estímulos novos (novidade). Essa ativação levaria a inibição do comportamento em curso, aumento da vigilância e da atenção e preparo para ação física vigorosa.

Na segunda edição do livro *Neuropsychology of Anxiety*, Gray e McNaughton (2000) publicaram a última formulação dessa teoria, de acordo com a qual a principal função do SSH seria a de detectar conflitos entre tendências de aproximação e esquiva. Quando um mesmo objetivo induz ambas as tendências, configura-se o conflito de esquiva-aproximação, que ao ser detectado pelo SSH gera a ansiedade.

Vale ressaltar que é a interação do SSH com outras estruturas que determinaria as alterações comportamentais decorrentes da ativação do SIC. Nesse sentido, os autores destacam a participação da amígdala, que nesse sistema, contribuiria com os aspectos afetivos e neurovegetativo da ansiedade, enquanto o SSH seria responsável por seu componente cognitivo.

1.3. Hipocampo - diferenciação anatomo-funcional

O hipocampo surge na escala filogenética nos representantes mais primitivos dos mamíferos (O'KEEFE; NADEL, 1978), sendo que os princípios fundamentais de sua disposição estrutural se mantêm relativamente estáveis entre as diferentes espécies (WEST, 1990).

Anatomicamente, o hipocampo pode ser descrito como uma estrutura bilateral, alongada e curva, composta por uma malha unidirecional de vias excitatórias, podendo ser dividido em quatro regiões: giro dentado (GD) e as três regiões do corno de Ammon CA1, CA2 e CA3. O GD é a área de entrada do hipocampo e recebe projeções aferentes principalmente do córtex entorrinal. As eferências do GD se projetam para as regiões CA3 e CA2, que por sua vez seguem para a área de saída do hipocampo, a CA1 (AMARAL; LAVENEX, 2007; DREMENCOV et al., 2003). Embora este padrão intrínscio de conectividade se repita basicamente ao longo de todo o seu eixo longitudinal (ANDERSEN; BLISS; SKREDE, 1971¹ apud MOSER; MOSER, 1998. p. 609), as vias aferentes e eferentes de conexão com outras estruturas encefálicas muda do pólo dorsal para o pólo ventral.

A porção dorsal do hipocampo recebe aferências principalmente da porção cortical lateral, mais relacionada a funções sensoriais ou exteroceptiva, enquanto que o hipocampo ventral recebe aferências de partes mais mediais do córtex entorrinal, que mais provavelmente seriam responsáveis por transmitir informações que refletem o estado interoceptivo do indivíduo. Além disso, conexões recíprocas com estruturas subcorticais, como a amígdala estão limitadas aos níveis ventral e

¹ ANDERSEN, P.; BLISS, T.V.P.; SKREDE, K.K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res*.13:222–238, 1971.

intermediário do hipocampo, estando ausentes na porção dorsal, que projeta suas aferências principalmente para o neocórtex (DOLORFO; AMARAL, 1998; WITTER et al., 1989; WITTER, 2001).

Apesar de desempenhar papel fundamental nas teorias neurobiológicas das emoções (GRAY, 1982; MACLEAN, 1949; PAPEZ, 1937² apud ENGIN; TRIET, 2007. p. 365), ainda há um debate em torno da função do hipocampo na cognição e na emoção, que está intimamente relacionado com sua distinção em duas sub-regiões, o hipocampo dorsal e o hipocampo ventral (posterior e anterior em humano) (MOSER; MOSER, 1998).

Há evidências que apontam a porção ventral como mais especializada em funções relacionadas à ansiedade, enquanto que a porção dorsal poderia estar mais envolvida em funções relacionadas à memória (para revisão ver BANNERMAN et al., 2004). Porém, a maioria dos estudos que relatam um papel menos importante do HD sobre a modulação da ansiedade se utilizam de técnicas de lesões (DEGROOT; TRIET, 2004; PENTKOWSKI et al., 2006) ou inativação temporária (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES; 2006). Embora contribuam para uma análise inicial das funções cerebrais, a inespecificidade das técnicas de lesões, no entanto, podem fornecer informações generalistas. Por exemplo, lesões eletrolíticas causam danos tanto às fibras de passagem, quanto aos corpos celulares, não podendo discriminar as funções de um ou outro. Mesmo lesões específicas de corpos celulares, axônios ou sistemas de neurotransmissão fornecem informações limitadas sobre a função de populações específicas de receptores dentro da área cerebral lesada. Isto é particularmente importante, porque a função de diferentes receptores na mediação da ansiedade pode ser única, e até dentro de um mesmo sistema de

² PAPEZ, J.W. A proposed mechanism for emotion. *Arch Neurol Psychiatry*. 79:237–244, 1937.

neurotransmissão desempenhar funções distintas, que podem variar em sub-regiões de uma mesma estrutura (ENGIN; TRIET, 2007).

De acordo com levantamentos realizados por Engin e Triet (2007, 2008), que considerou modelos de ansiedade incondicionada e intervenções neurofarmacológicas, o HD também desempenharia papel na modulação da ansiedade.

Nesse sentido, estudos mostram que a injeção nesta porção do hipocampo, tanto do benzodiazepínico midazolam, quanto do agonista de receptores GABA_A muscimol, promoveram efeito do tipo ansiolítico, em ratos avaliados no modelo do labirinto em cruz elevado (GONZALEZ; OUAGAZZAL; FILE, 1998; MENARD; TREIT, 2001; REZAYAT et al., 2005) e no teste de interação social (GONZALEZ; OUAGAZZAL; FILE, 1998; IRVINE et al., 2001).

Recentemente, Casarotto e colaboradores (2012) demonstraram esse mesmo efeito ansiolítico decorrente da injeção intra-HD de midazolam, em ratos testados no LTE, um modelo utilizado no presente estudo (ver a seguir maiores detalhes).

1.4. Serotonina, ansiedade e o hipocampo dorsal

A confirmação clínica das propriedades ansiolíticas de drogas que modulam a neurotransmissão serotoninérgica, como a buspirona (EISON et al., 1989) e de antidepressivos/ansiolíticos (ARGYROPOULOS; SANDFORD; NUTT, 2000), impulsionou a investigação sobre o envolvimento da serotonina na fisiopatologia da ansiedade, bem como do mecanismo de ação dessas drogas (GRAEFF, 1981, 1990, 1993, 1994; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; GRIEBEL, 1995; ZANGROSSI et al., 2001).

Apesar de alguns desses estudos apontarem para o papel ansiogênico da serotonina (GELLER; BLUM, 1970; GRAEFF; SCHOENFELS, 1970; HODGES; GREEN; GLENN, 1987; TYE; EVERITT; IVERSEN, 1977; WISE; BERGER; STEIN, 1972), outros estudos mostravam papel ansiolítico deste neurotransmissor (JENCK; BROEKKAMP; VAN DELFT, 1990; KISER et al., 1980; NOGUEIRA; GRAEFF, 1995) na modulação das respostas defensivas relacionadas à ansiedade.

Essas duas linhas de evidências contraditórias tinham como base resultados obtidos em modelos animais distintos (GRAEFF, 2004). A primeira vertente utilizou-se de modelos de conflito (ou punição), que avaliam respostas de esquiva ou aproximação da fonte de perigo, e a segunda, tendo como foco a substância cinzenta periaquedutal (SCP), valeu-se do modelo de estimulação elétrica ou química da parte dorsal da SCP para analisar o comportamento de fuga em animais de laboratório (GRAEFF, 2003). Esse paradoxo (a serotonina aumenta e diminui a ansiedade) é configurado quando se considera que ambos os modelos estejam relacionados ao mesmo estado emocional, porém é resolvido ao assumir-se que as

diferentes respostas geradas estariam relacionadas a diferentes emoções e consequentemente a transtornos de ansiedade distintos (GRAEFF, 2004).

Nesta direção, esses resultados aparentemente contraditórios, levaram à postulação da hipótese do papel dual da serotonina nos transtornos de ansiedade (DEAKIN; GRAEFF, 1991). De acordo com essa hipótese, a serotonina facilitaria as respostas defensivas relacionadas à ansiedade, como a esquiva inibitória, e ao contrário, inibiria as respostas defensivas relacionadas ao medo, como a fuga.

Com a finalidade de testar esta teoria em laboratório, foi desenvolvido o modelo do LTE (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; GRAEFF; NETO; ZANGROSSI, 1998; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997) no qual é possível avaliar separadamente, em um mesmo animal, duas respostas defensivas distintas, a esquiva inibitória e a fuga, que têm sido, como mencionado acima, relacionados respectivamente, aos transtornos de ansiedade generalizada e ao transtorno do pânico (GRAEFF, 2004; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; ZANGROSSI et al., 2001).

De acordo com levantamento recente de Graeff e Zangrossi (2010), analisando estudos que testaram essa hipótese, a serotonina parece facilitar a resposta de esquiva inibitória (relacionada ao transtorno de ansiedade generalizada) por agir em estruturas prosencefálicas, como o sistema septo-hipocampal e amígdala, e inibe a resposta de fuga (relacionada ao transtorno do pânico) promovida pela substância cinzenta periaquedutal dorsal.

De fato, o sistema de neurotransmissão serotoninérgica é altamente complexo. As principais fontes ascendentes de serotonina, os núcleos dorsal (NDR) e mediano (NMR) da rafe, além de apresentarem um elevado grau de heterogeneidade neuronal, se projetam para conjuntos distintos de estruturas cerebrais. Embora

existam sobreposições, ou seja, uma mesma região encefálica recebe projeções serotoninérgicas tanto do NDR, quanto do NMR, como por exemplo, acontece na porção ventral do hipocampo, de maneira geral, algumas estruturas recebem projeções relativamente seletivas de um destes núcleos (HENSLE, 2006; MILLAN, 2003). De especial interesse para o presente estudo, a porção dorsal do hipocampo destaca-se por ser predominantemente inervada pelo NMR (MCKENNA; VERTES, 2001; MCQUADE; SHARP, 1997; VERTES; FORTIN; CRANE, 1999).

Associado a essa complexidade, outro fator que tem dificultado o entendimento do papel da serotonina na modulação da ansiedade e do medo é a diversidade de seus receptores. São conhecidos pelo menos 14 subtipos de receptores serotoninérgicos, que podem estar localizados tanto pré quanto pós-sinapticamente, e sua ativação algumas vezes produz efeitos opostos (HANNON; HOYER, 2008; HOYER; HANNON; MARTIN, 2002). Entre os receptores caracterizados, os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} têm sido mais frequentemente associados à fisiopatologia de diferentes transtornos de ansiedade (DEAKIN et al., 1992; GRAEFF; VIANA; MORA., 1997; MILLAN 2003; MILLAN, 2005).

Sabe-se que as funções hipocâmpais são altamente reguladas pelo sistema serotoninérgico (HJORTH, et al., 2000). Adicionalmente, disfunções da neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo têm sido implicadas na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade e depressão. Além disto, alterações no funcionamento do sistema serotoninérgico hipocâmpal têm sido relacionadas a melhora destes quadro após tratamento com antidepressivos/ansiolíticos (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; HJORTH et al., 2000).

Estudos com microinjeções intra-HD do agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, mostram resultados que evidenciam a atividade serotoninérgica, dessa porção

na modulação da ansiedade (ANDREWS et al., 1994; FILE; GONZALEZ; ANDREWS, 1996; JOLAS, et al., 1995; MENARD; TREIT, 1998; SCHREIBER; DEVRY, 1993). Por exemplo, avaliando o resultado dessa manipulação em ratos submetidos ao modelo do LTE, dos Santos e colaboradores (2008), observaram efeito do tipo ansiogênico sobre a resposta de esquiva inibitória, sem alteração na resposta de fuga.

Além dos receptores do tipo 5-HT_{1A}, também são encontrados no hipocampo expressivos níveis de sítios de ligações de receptores do tipo 5-HT_{2C} (ABRAMOWSKI et al., 1995; CLEMETT et al., 2000; POMPEIANO; PALACIO; GENGOD, 1994). Tais receptores, foco do presente trabalho, estão distribuídos pós-sinapticamente no sistema nervoso central, sendo encontrados também, no córtex, gânglios da base (caudado e substancia nigra), amígdala e núcleo acumbens (BARNES; SHARP, 1999; HOYER; HANNON; MARTIN, 2002; MENGOD et al., 2010).

O receptor 5-HT_{2C}, assim como a grande maioria dos receptores serotoninérgicos, pertence à superfamília dos receptores metabotrópicos. Acoplado a proteína G_q, quando ativado esse receptor promove aumento dos níveis de Ca⁺² intracelular e consequente despolarização neuronal (HOYER; HANNON; MARTIN, 2002; VAN OEKELLEN; LUYTEN; LEISEN, 2003).

Apesar de exibir expressiva homologia com os demais receptores da classe 5-HT₂ (5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}), compartilhando com estes, por exemplo, a característica excitatória acima descrita, o receptor 5-HT_{2C} destaca-se por ser o único receptor metabotrópico a apresentar isoformas (BARNES; SHARP, 1999; BOCKAERT et al., 2010; HOYER; HANNON; MARTIN, 2002).

As mais de 14 isoformas desse receptor resultam de alterações que podem ocorrer no seu processo de síntese (BURNS et al., 1997; FITZGERALD et al., 1999).

Assim, modificações na transcrição do mRNA promovem a tradução de proteínas diferenciadas, ou seja, isoformas do mesmo receptor, que variam quanto à distribuição encefálica e à afinidade pela 5-HT (GUREVICH et al., 2002a; QUIRK et al., 2001; WERRY et al., 2008). Além disso, quadros clínicos como a depressão, ou ainda, tratamentos com antidepressivos podem alterar esse processamento do mRNA, modificando a expressão das diferentes isoformas em determinadas estruturas cerebrais (ENGLANDER et al., 2005; GIORGETTI; TECOTT, 2004; GUREVICH et al., 2002b).

A compreensão do papel dos receptores 5-HT_{2C} na ansiedade experimental tem sido dificultada pela complexidade desses receptores, bem como pela falta de ligantes mais seletivos.

A ativação dos receptores 5HT_{2C} em áreas límbicas, como por exemplo, o núcleo basolateral do complexo amigdalóide, a substância cinzenta periaquedutal dorsal e a porção ventral do hipocampo (ALVES et al., 2004; CAMPBELL; MERCHANT, 2003; VICENTE; ZANGROSSI, 2012; YAMASHITA; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011) tem sido associada ao desencadeamento da ansiedade. Além disso, a administração sistêmica de agonistas de receptores 5-HT_{2C} promove efeito do tipo ansiogênico em diferentes modelos experimentais (para revisão ver GRIEBEL, 1995; GRIEBEL; PERRAULT; SANGER, 1997).

Com base nestas e outras evidências, Millan (2005), sugere que a dessensibilização dos receptores 5-HT_{2C} esteja envolvida no efeito ansiolítico observado no tratamento crônico com antidepressivos. Recentemente, Vicente e Zangrossi (2012) demonstraram em ratos a participação dos receptores 5-HT_{2C} do

núcleo basolateral do complexo amidalóide na mediação do efeito ansiogênico indesejado, após administração a curto-prazo de antidepressivo.

Além disso, evidências experimentais e clínicas atribuem propriedades ansiolíticas aos antagonistas desses mesmos receptores (MILLAN, 2003; VICENTE; ZANGROSSI, 2012). Estas observações apontam os receptores 5-HT_{2C} como alvo farmacológico na busca de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dos quadros de ansiedade.

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo estender a investigação da participação da neurotransmissão serotoninérgica do HD na modulação das respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao medo, contribuindo com análise da participação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{2C} sobre a mediação dessas respostas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

O presente trabalho teve por objetivo verificar a participação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2C} do HD na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade generalizada e ao pânico.

2.2. *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito de injeções bilaterais intra-HD dos agonistas de receptores do tipo 5-HT_{2C} MK-212 e RO-600175, do agonista de preferencial de receptores 5-HT_{2A} DOI, ou ainda, do antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2C} SB-242084 em ratos submetidos ao LTE.

A fim de verificar se os resultados obtidos no teste do LTE poderiam ser decorrentes de possíveis efeitos sobre a atividade locomotora dos animais, o comportamento dos mesmos também foi avaliado no teste do campo aberto.

- Para fins comparativos, os efeitos dos agonistas MK-212 e RO-100635 e do antagonista SB-242084, foram avaliados em animais submetidos ao teste do beber punido de Vogel, outro modelo experimental associado á ansiedade.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 200-220g no dia da cirurgia estereotáxica, provenientes do biotério Central da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto. Os animais permaneceram durante todo o experimento no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, onde ficaram alojados (quatro a seis animais por caixa) em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm), forradas com serragem, tendo livre acesso à água e ração, exceto no período de privação de água, para os animais submetidos ao teste de Vogel. O biotério foi mantido sobre condições controladas, com temperatura em $22 \pm 1^\circ \text{C}$, luminosidade de 40 lux e ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 às 19:00h).

3.2. Drogas

- MK-212 [cloridrato de 6-Cloro-2-(1-piperazinil) pirazina; Tocris, EUA];
- RO-600175 [fumarato de (aS)-6-Cloro-5-fluor-a-metil-1H-indol-1-etanamina; Tocris, EUA];
- DOI [1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano], Sigma, EUA]
- SB-242084 {dicloreto hidratado de 6-Cloro-2,3-di-hidro-5-metil-N-[6-[(2-metil-3-piridinil)oxi]-3-piridinil]-1H-indol-1-carboxiamida; Sigma, EUA};

As drogas utilizadas foram dissolvidas em salina estéril, com exceção das maiores doses de RO-600175 (20 e 40 nmol) que foram dissolvidas em uma solução de salina estéril contendo 4% DMSO (dimetil-sulfóxido, Sigma, EUA).

3.3. Aparatos

3.3.1. Labirinto em T elevado

O LTE (Figura 1) é constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões (50 cm de comprimento por 12 cm de largura). Um dos braços é circundado por paredes laterais opacas (40 cm de altura) e está disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que permanecem abertos. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma proteção de acrílico transparente (1 cm de altura). Todo o conjunto está elevado 50 cm em relação ao solo.

Figura 1. Labirinto em T elevado

3.3.2. Campo aberto

O teste foi conduzido em uma arena de acrílico preto (Figura 2), medindo 60 x 60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura.

A luminosidade medida na sala experimental, tanto no centro da arena, quanto na área de cruzamento entre os braços do LTE foi de 40 lux.

Figura 2. Campo aberto

3.3.3. Teste do beber punido de Vogel e teste de consumo de água

O conjunto do aparato empregado no teste fica dentro de uma caixa acústica, e 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 (Figura 3).

Figura 3. Teste de Vogel

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, do bico, um choque elétrico de 0,5 mA, durante dois segundos. O sensor registrou o número de lambidas e choques durante o período do teste.

O consumo de água dos animais frente aos tratamentos foi avaliado no mesmo aparato descrito acima, porém com a função de emissão de choques-elétricos inoperante.

3.4. Procedimentos

3.4.1. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich, EUA) a 2,5% (10 ml/kg, i.p.). Após a tricotomia na região da cabeça, o animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA) pelo rochedo temporal e incisivos superiores, de forma que a barra dos incisivos estava situada 2,5 mm abaixo do plano interaural. Uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fort-Dodge-Brasil) foi administrada (0,2 ml/animal, i.m.), a fim de prevenir possíveis infecções.

Após a realização da anti-sepsia do campo cirúrgico com uma solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%, foi administrado, via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol 100, S.S. White-Brasil). Posteriormente, foi realizada a incisão longitudinal dos tecidos cutâneos e subcutâneos, e remoção do periósteo por raspagem, a fim de expor o crânio.

Através de orifícios na superfície craniana, perfurados utilizando-se uma broca, cânulas guia de 10 mm (0,6 mm de diâmetro externo) foram introduzidas bilateralmente no encéfalo. As cânulas foram direcionadas ao HD de acordo com as seguintes coordenadas: antero-posterior = - 3,9 mm, latero-lateral = $\pm$ 2,8 mm e dorso-ventral = - 2,1 mm, inclinação da haste = 0°, tendo o Bregma como referência (Paxinos e Watson, 2007). As cânulas foram fixadas no crânio por uma prótese de resina acrílica auto-polimerizante estabilizada por um parafuso de aço inoxidável fixado à calota craniana. Finalmente, foi introduzido em cada cânula guia um mandril de aço inoxidável, de mesmo comprimento, para prevenir possíveis obstruções.

Ao final do procedimento foi administrada uma dose de 2,5 mg/ml/kg (s.c.) do agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética Banamine (Schering-Ploug S/A-Brasil).

Após a cirurgia, os animais retornaram ao biotério do laboratório, respeitando as mesmas condições de alojamento, onde permaneceram de cinco a sete dias até a realização dos testes comportamentais.

3.4.2. Injeções intra-hipocampo dorsal

No dia do teste, em todos os experimentos, a injeção foi feita simultaneamente nos dois hemisférios cerebrais por meio de duas agulhas odontológicas (Mizzy, 11,5 mm) inseridas pelas cânulas guia, até atingir o alvo 1,5 mm abaixo da extremidade das cânulas. Cada agulha odontológica foi conectada a uma microseringa (Hamilton 701-RN, EUA) de 10 μ l 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 do sucesso da micro-injeção. Para controle do volume e do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba micro-injetora digital (Harvard Apparatus, modelo 55-2222) programada para injeção 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.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em diferentes grupos de tratamento e a administração das drogas em estudo foi realizada segundo as etapas e grupos experimentais descritos abaixo.

As doses utilizadas no presente estudo foram selecionadas de acordo com resultados prévios obtidos na literatura, utilizando a administração dos mesmos

agonistas e antagonistas de receptores 5-HT_{2C} e agonista de preferencial de receptores 5-HT_{2A} em estruturas encefálicas como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003; YAMASHITA; DE BORTOLI; ZANGROSSI; 2011) e o núcleo basolateral da amígdala (VICENTE; ZANGROSSI, 2012).

3.4.3. Testes comportamentais

3.4.3.1. Avaliação no Labirinto em T elevado e teste do campo aberto

Dois dias antes do início dos testes, os animais foram manuseados pelo experimentador, uma vez ao dia, durante 5 minutos. Após cada sessão de manuseio, os animais foram colocados por 5 minutos em uma caixa de acrílico (24 x 18 x 35 m) com serragem no assoalho. Esta caixa foi posteriormente utilizada como coadjuvante na execução do teste do LTE. A sala onde os testes e a habituação foram executados possui as mesmas condições de luminosidade e temperatura do biotério, e um exaustor de ar que emite um ruído de fundo constante.

No dia seguinte à última sessão de habituação (24 horas antes do teste), os animais foram pré-expostos por 30 minutos a um dos braços abertos do LTE. Cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos que permaneceu isolado dos demais braços por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto. Este procedimento potencializa a expressão do comportamento de fuga por reduzir respostas comportamentais à novidade, tais como a exploração e a inibição comportamental (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000).

No dia do teste, para a execução do experimento 1, após sorteio prévio, os animais receberam injeção bilateral intra-HD do agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2C}, MK-212 (0,01; 0,1 e 1 nmol; n=9-11) ou salina (n=11).

No experimento 2, os animais foram microinjetados com veículo ou salina, compondo o grupo controle (n=17), ou com o agonista de receptores 5-HT_{2C}, RO-600175 (0,4; 4; 20 e 40 nmol; n=8-10).

No experimento 3, os animais receberam microinjeções de DOI, agonista preferencial de receptores do tipo 5-HT_{2A} (4, 8 e 16 nmol; n=8-9), ou salina (n=9).

Encerrando a etapa inicial do estudo, no experimento 4, os animais foram injetados com salina (n=19) ou SB-242084, antagonista de receptores do tipo 5-HT_{2C} (0,01; 0,1; 1 nmol; n=18-19).

Após dez minutos (experimentos 1,2 e 4), ou vinte minutos (experimento 3), os animais foram testados sequencialmente no LTE e no teste do campo aberto.

O teste LTE se inicia com a tomada da esquiva inibitória. Para tal, o animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e a latência de saída, com as quatro patas, deste braço foi cronometrada (Linha de base). A mesma medida foi tomada por mais 2 vezes com intervalos regulares de 30 segundos entre elas (Esquiva 1 e Esquiva 2). O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tentativas, foi de cinco minutos. Depois deste período, o animal era retirado pelo experimentador para dar continuidade ao teste.

Trinta segundos após a tomada da esquiva 2, foi verificada a latência de fuga dos animais de um dos braços abertos do labirinto. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto ao qual foi anteriormente pré-exposto, e o tempo de saída deste braço, com as quatro patas, foi cronometrado (Fuga1). A latência de saída de um dos braços abertos foi tomada por mais duas

vezes (Fuga2 e Fuga3), também com intervalos de trinta segundos entre elas. Durante os intervalos os animais foram colocados na caixa de acrílico descrita no procedimento de habituação. Ao final do teste de cada animal, o aparato foi limpo com álcool a 20%, assim como os outros aparatos utilizados.

Imediatamente após a tomada da fuga 3, cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto e durante 5 minutos, a distância total percorrida por cada animal foi registrada por meio do programa analisador de imagem (Ethovision – versão 1.96; Noldus, Holanda).

Para fins comparativos, grupos independentes de animais, sem exposição prévia ao LTE, também passaram por avaliação da atividade locomotora. Assim, no experimento 5, os animais receberam injeção intra-HD de MK-212 (0,01; 0,1 nmol; n=9-10), RO-600175 (20 nmol; n=8), ou salina (n=9) e dez minutos após foram submetidos ao teste do campo aberto.

3.4.3.2. Avaliação no teste do beber punido de Vogel

Na segunda etapa da investigação (experimentos 6, 7 e 8), grupos independentes de animais, foram avaliados no teste do beber punido de Vogel.

Os animais foram primeiramente privados de água por 48 horas antes do teste. Após as primeiras 24 horas, na sessão treino, foi permitido a cada animal beber livremente na caixa-teste por três minutos. Esse procedimento foi realizado para que o animal encontrasse o bico do bebedouro.

Vinte e quatro horas após a sessão treino, os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupo e receberam microinjeção de MK-212 (0,01; 0,1 e 1 nmol; n=9-10) ou salina (n=11), no experimento 6, RO-600175 (4; 20 e 40 nmol; n=8-9) ou veículo (n=10), no experimento 7 e por fim, no experimento 8, salina (n=8) ou SB-242084, (0,01; 0,1; 1 nmol; n=8-10).

Dez minutos após a injeção, os animais foram individualmente colocados na caixa-teste por três minutos, contados a partir do momento em que o bico do bebedouro era encontrado. Durante este período, a cada 20 lambidas, os animais recebiam, através do bico do bebedouro, um choque de 0,5 mA durante dois segundos.

3.4.3.3. Teste de consumo de água

Três dias após serem testados no campo aberto, os animais do experimento 5 foram novamente sorteados, receberam microinjeção de salina (n=5), MK-212, (0,1 nmol; n=7), ou RO-600175 (20 nmol; n=7) e após dez minutos foram submetidos ao teste de consumo de água (experimento 9).

No experimento 10, um grupo de animais ingênuos foi aleatoriamente sorteado e recebeu injeções intra-HD de salina (n=7) ou SB-242084 (n=8) e também após dez minutos, foi submetido ao teste de consumo de água. Este procedimento permite observar possível efeito inespecífico (ingestão de água) dos tratamentos adotados no teste do beber punido de Vogel.

O mesmo procedimento descrito acima, para o teste do beber punido de Vogel, foi seguido para o teste de consumo de água. Com exceção, da função choque no dia do teste, que para a avaliação do consumo de água permaneceu desativada, permitindo que os animais ingerissem água livremente durante os três minutos, e assim o número de lambidas não punidas fosse contabilizado.

Tanto no teste do beber punido de Vogel, quanto no teste de consumo de água o procedimento adotado foi baseado no protocolo experimental descrito por Pelosi e colaboradores (2009).

3.5. Perfusão

Para a verificação da localização do sítio de injeção, os animais foram anestesiados com uretana a 25% (3 ml/animal,i.p.) e passaram por perfusão intracardiaca com salina (NaCl a 0,9%) seguida por formol (10%). Anteriormente a perfusão, utilizando uma agulha (Mizzy, 11,5 mm) inserida pela cânula guia, foi feita a injeção de 0,2 µl de corante azul de Evans a 1%. Os encéfalos foram removidos e mantidos por, no mínimo, 48 horas em formol a 10%, até a confecção das lâminas histológicas.

3.6. Histologia

Os encéfalos foram levados ao criostato (Leica CM1850), onde secções coronais de 60 µm foram realizadas e adequadamente montadas em lâminas para verificação microscópica do sítio de microinjeção, segundo diagramas reproduzidos do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram incluídos nas análises estatísticas somente os dados dos animais que tiveram os sítios de microinjeção localizados no HDI nos dois hemisférios cerebrais.

3.7. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos no LTE (latências de esquiva inibitória e fuga) foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fator independente o tratamento e como medidas repetidas as diferentes tentativas efetuadas, latências de esquiva inibitória (Linha de Base, Esquiva 1, Esquiva 2) ou fuga (Fuga 1, Fuga 2, Fuga 3). Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

A distância percorrida no campo aberto, assim como os dados do teste de Vogel e consumo de água, foram analisados utilizando a ANOVA de uma via ou teste *t* Student. Para as análises *post-hoc*, também foi empregado o teste de Duncan.

Os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Nos casos em que o teste acusou heterogeneidade dos grupos, os dados foram convertidos em log de base 10 e, posteriormente submetidos à ANOVA.

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (epm). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análise histológica

Os sítios de microinjeção no HD dos experimentos realizados estão representados na figura 4.

Figura 4. Representação dos sítios de microinjeção no HD observados em todos os experimentos, através do plano ântero-posterior (Bregma -3,12 a -3,72 mm) conforme o Atlas Paxinos e Watson (2007). O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

4.2. Experimento 1

Efeito da administração intra-HD de MK-212

Labirinto em T elevado

A Figura 5 mostra os comportamentos de esquiva inibitória (painel A) e fuga (painel B) de animais que receberam injeções de MK-212 ou salina e foram testados no LTE.

A ANOVA mostrou que houve aquisição da resposta de esquiva inibitória (painel A) [fator tentativa: $F(2,74)=6,54$; $p<0,05$] e interação entre os fatores tentativa e tratamento [fator interação: $F(6,74)=0,46$; $p<0,05$]. Houve ainda, efeito marginal do tratamento [fator tratamento: $F(3,37)=2,38$; $p=0,085$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com MK-212 nas doses de 0,01 e 0,1 nmol prejudicou a aquisição da Esquiva 2 ($p<0,05$), quando comparado ao grupo salina.

No que diz respeito à resposta de fuga, ilustrada no painel B da mesma figura, a ANOVA revelou que não houve efeito das tentativas [$F(2,74)=0,09$; NS], do tratamento [$F(3,37)=2,46$; NS], nem da interação tentativa-tratamento [$F(6,74)=0,46$; NS].

A **B**

Figura 5. Efeito (média + EPM) da injeção de salina ou MK-212 (0,01; 0,1 e 1 nmol) intra-HD sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE (n = 9 - 11 por grupo). * $p < 0,05$, em relação ao grupo salina, em uma mesma tentativa.

Campo aberto

A administração intra-HD de MK-212 não promoveu alteração na distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto em nenhuma das doses testadas [$F(3,37)=1,86$; NS], como observado na Tabela 1.

Tabela 1- Média ($\pm$ EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos à injeção intra-HD de salina ou MK-212.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m)
Salina	9,13 $\pm$ 1,90
MK (0,01 nmol)	15,14 $\pm$ 2,30
MK (0,1 nmol)	14,26 $\pm$ 2,67
MK (1 nmol)	14,69 $\pm$ 2,52

4.3. Experimento 2

Efeito da administração intra-HD de RO-600175

Labirinto em T elevado

A Figura 6 mostra os comportamentos de esquiva inibitória (painel A) e fuga (painel B) de animais que receberam injeções de RO-600175, ou solução controle e foram submetidos ao LTE.

Em relação à resposta de esquiva inibitória (painel A), a ANOVA mostrou que houve aquisição desta [fator tentativa: $F(2,92)=29,31$; $p<0,05$], além do efeito do tratamento [fator tratamento: $F(4,46)=5,11$; $p<0,05$] e interação entre estes dois fatores [fator interação $F(8,92)=2,61$; $p<0,05$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com RO-600175 na dose de 20 nmol prejudicou a aquisição dessa resposta já na linha de base ($p<0,05$), quando comparado aos demais grupos. O mesmo efeito foi observado na Esquiva 2, em decorrência do tratamento com as doses de 20 e 40 nmol ($p<0,05$).

O tratamento não promoveu alterações sobre a resposta de fuga (figura 6- painel B). A ANOVA revelou que não houve efeito das tentativas [$F(2,92)=1,75$; NS], do tratamento [$F(4,46)=0,85$; NS], nem interação tentativa-tratamento [$F(8,92)=1,47$; NS].

Figura 6. Efeito (média + EPM) da injeção de veículo ou salina (controle), ou RO-600175 (0,4; 4; 20 e 40 nmol) intra-HD sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE (n = 8- 17 por grupo). * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle em uma mesma tentativa.

Campo aberto

Conforme observado na Tabela 2, a administração intra-HD de RO-600175 não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(4,46)=0,49$; NS].

Tabela 2- Média ($\pm$ EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos à injeção intra-HD de solução controle ou RO-600175.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m)
Controle	12,37 $\pm$ 1,18
RO (0,4 nmol)	13,17 $\pm$ 1,45
RO (4 nmol)	12,81 $\pm$ 1,28
RO (20 nmol)	11,45 $\pm$ 1,00
RO (40 nmol)	14,32 $\pm$ 1,08

4.4. Experimento 3

Efeito da administração intra-HD de DOI.

Labirinto em T elevado

A Figura 7 mostra os comportamentos de esquiva inibitória (painel A) e fuga (painel B) de animais que receberam injeções de DOI ou salina e foram testados no LTE.

A ANOVA mostrou que houve aquisição de esquiva inibitória (painel A) [fator tentativa: $F(2,62)=19,76$; $p<0,001$]. Porém não houve efeito do tratamento [$F(3,31)=0,69$; NS], nem interação entre os fatores tentativa e tratamento [$F(6,42)=0,83$; NS].

O painel B da mesma figura ilustra a ausência de efeito dessa droga sobre a resposta de fuga. A ANOVA revelou que não houve efeito das tentativas [$F(2,62)=0,49$; NS], do tratamento [$F(3,31)=0,78$; NS], nem interação entre esses fatores [$F(6,62)=0,32$; NS].

Figura 7. Ausência de efeito (média + EPM) da injeção de salina ou DOI (4; 8 e 16 nmol) intra-HD sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no LTE (n = 8 - 9 por grupo).

Campo aberto

Nenhuma das doses utilizadas promoveu alterações significativas na distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(3,31)=2,27$; NS], como observado na Tabela 3.

Tabela 3- Média ($\pm$ EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos à injeção intra-HD de salina ou DOI.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m)
Salina	15,29 $\pm$ 2,89
DOI (4 nmol)	15,89 $\pm$ 1,73
DOI (8 nmol)	9,71 $\pm$ 1,58
DOI (16 nmol)	18,28 $\pm$ 2,77

4.5. Experimento 4

Efeito da administração intra-HD de SB-242084

Labirinto em T elevado

A Figura 8 mostra os comportamentos de esquiva inibitória (painel A) e fuga (painel B) de animais que receberam injeções de SB-242084 ou de salina e foram testados no LTE.

A ANOVA mostrou que houve aquisição da esquiva inibitória (painel A) [fator tentativa: $F(2,140)=54,87$; $p<0,001$], e efeito do tratamento [fator tratamento: $F(3,70)=3,06$; $p<0,05$]. Além disso, foi observado efeito em relação à interação entre estes dois fatores [fator interação: $F(6,140)=3,68$; $p<0,05$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com SB-242084, na dose de 0,1 nmol facilitou a aquisição da Esquiva 1 ($p<0,05$), quando comparado ao grupo salina. Na resposta de Esquiva 2 ($p<0,05$), o tratamento nas doses de 0,01 e 0,1 nmol alteraram essa resposta no mesmo sentido.

Nesta mesma figura, o painel B ilustra a ausência de efeito do tratamento sobre a resposta de fuga. A ANOVA revelou que não houve efeito das tentativas [$F(2,140)=0,23$; NS], do tratamento [$F(3,70)=0,55$; NS], nem da interação tentativa-tratamento [$F(6,140)=0,99$; NS].

Figura 8. Efeito (média + EPM) da injeção de salina ou SB-242084 (0,01; 0,1 e 1 nmol) intra-HD sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e fuga (B) no teste do LTE (n= 18 - 19 por grupo). * $p < 0,05$, em relação ao grupo salina em uma mesma tentativa.

Campo aberto

Como observado na Tabela 4, o tratamento com SB-242084 não promoveu alteração significativa na distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(3,70)=0,67$; NS].

Tabela 1

Tabela 4- Média ($\pm$ EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos à injeção intra-HD de salina ou SB-242084.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m)
Salina	14,65 $\pm$ 1,05
SB (0,01 nmol)	13,30 $\pm$ 1,89
SB (0,1 nmol)	11,58 $\pm$ 1,93
SB (1 nmol)	12,00 $\pm$ 1,76

4.6. Experimento 5

Efeito da ativação dos receptores do tipo 5-HT_{2C} do HD de ratos submetidos ao teste do campo aberto

A figura 9 ilustra o comportamento de animais que receberam injeções intra-HD de salina, MK-212 (0,01; 0,1 nmol) ou RO-600175 (20 nmol) e foram submetidos ao teste do campo aberto.

A ANOVA mostrou que nenhum dos tratamentos empregados promoveu alterações significativas sobre a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(3,32)=0,49$; NS].

Figura 9. Ausência de efeito (Média ± EPM) da injeção intra-HD de MK-212 (0,01 e 0,1 nmol) RO-600175 (20 nmol) ou salina sobre a distância percorrida no teste do campo aberto (n = 8 - 10 por grupo).

4.7. Experimento 6

Efeito da administração intra-HD de MK-212 em ratos submetidos ao teste do beber punido de Vogel

A figura 10 ilustra o comportamento de animais que receberam injeções intra-HD de salina ou MK-212, nas doses de 0,01; 0,1 ou 1 nmol, e foram submetidos ao teste do beber punido de Vogel.

A ANOVA apontou efeito do tratamento [$F(3,36)=3,18$; $p < 0,05$] sobre o número de lambidas punidas. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com MK-212 na dose de 0,1 nmol aumentou o número de lambidas punidas, quando comparado ao grupo salina.

Figura 10. Efeito (média + EPM) da injeção intra-HD de MK-212 (0,01; 0,1 e 1 nmol) ou salina no número de lambidas punidas emitidas no teste do beber punido de Vogel ($n = 9 - 11$ por grupo). * $p < 0,05$, em relação ao grupo salina.

4.8. Experimento 7

Efeito da administração intra-HD de RO-600175 em ratos submetidos ao teste do beber punido de Vogel

A figura 11 ilustra o comportamento de animais que receberam injeções intra-HD de veículo ou RO- 600175, nas doses de 4, 20 ou 40 nmol, e foram submetidos ao teste do beber punido de Vogel.

A ANOVA mostrou efeito do tratamento [$F(3,31)=4,27$; $p<0,05$] sobre o número de lambidas punidas. O teste *post-hoc* de Duncan apontou que o tratamento com RO- 600175 na dose de 20 nmol aumentou o número de lambidas punidas, quando comparado aos demais grupos.

Figura 11. Efeito (média + EPM) da injeção intra-HD de RO-600175 (4; 20 e 40 nmol) ou veículo no número de lambidas punidas emitidas no teste do beber punido de Vogel ($n = 8 - 10$ por grupo). * $p < 0,05$, em relação aos demais grupos.

4.9. Experimento 8

Efeito da administração intra-HD de SB-242084 em ratos submetidos ao teste do beber punido de Vogel

A figura 12 ilustra o comportamento de animais que receberam injeções intra-HD de salina ou SB-242082, nas doses de 0,01; 0,1 ou 1 nmol, e foram submetidos ao teste do beber punido de Vogel.

A ANOVA apontou efeito do tratamento [$F(3,31)=3,51$; $p < 0,05$] sobre o número de lambidas punidas. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com SB-242084 na dose de 0,1 nmol diminuiu o número de lambidas punidas, quando comparado ao grupo salina.

Figura 12. Efeito (média + EPM) da injeção intra-HD de SB-242084 (0,01; 0,1 e 1 nmol) ou salina no número de lambidas punidas emitidas no teste do beber punido de Vogel ($n = 8 - 10$ por grupo). * $p < 0,05$, em relação aos demais grupos.

4.10. Experimento 9

Efeito da administração intra-HD de RO-600175 ou MK-212 em ratos submetidos ao teste de consumo de água

A figura 13 ilustra o comportamento de animais que receberam injeções intra-HD de salina, RO- 600175 (20 nmol) ou MK-212 (0,1 nmol) e foram submetidos ao teste de consumo de água.

A ANOVA não apontou alterações decorrentes dos tratamentos empregados na ingestão de água (número de lambidas não punidas) dos animais submetidos ao teste de consumo de água [$F(2,16)=0,04$; NS].

Figura 13. Ausência de efeito (média + EPM) da injeção intra-HD de MK-212 (0,1 nmol) RO-600175 (20 nmol) ou salina sobre o número de lambidas não punidas no teste de consumo de água (n = 5 - 7 por grupo).

4.11 Experimento 10

Efeito da administração intra-HD de SB-242084 em ratos submetidos ao teste de consumo de água

A figura 14 ilustra o comportamento de animais que receberam injeções intra-HD de salina ou SB-242084 (0,1 nmol) e foram submetidos ao teste de consumo de água.

O teste *t* Student não apontou alterações decorrentes do tratamento empregado na ingestão de água (número de lambidas não punidas) dos animais submetidos ao teste de consumo de água [$t(13)=0,02$; NS].

Figura 14. Ausência de efeito (média + EPM) da injeção intra-HD de SB-242084 (0,1 nmol) ou salina sobre o número de lambidas não punidas no teste de consumo de água (n = 7 - 8 por grupo).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo estender a análise da participação dos receptores serotoninérgicos do HD na modulação das respostas defensivas relacionadas à ansiedade generalizada e ao pânico. Nesse sentido, investigou-se a participação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{2C} sobre a mediação das respostas de esquiva inibitória e fuga, expressas por ratos submetidos ao LTE.

No que diz respeito à ativação desses receptores, observou-se nos dois primeiros experimentos, que tanto a injeção intra-HD do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C} MK-212 (5-HT_{2C}/K_i = 97,7 nmol, 5-HT_{2A}/K_i = 1023,3 nmol; KNIGHT et al., 2004), quanto do agonista desses mesmos receptores RO-600175 (5-HT_{2C}/K_i = 6 nmol, 5-HT_{2A}/K_i = 36,3 nmol; KNIGHT et al., 2004), prejudicaram a aquisição da resposta de esquiva inibitória no LTE, sem alterar a resposta de fuga, indicando a participação dos receptores 5-HT_{2C} neste efeito do tipo ansiolítico. A distância total percorrida pelos animais no teste do campo aberto não foi alterada pela injeção desses mesmos agonista, nem quando mensurada após a exposição ao LTE, ou de maneira independente (experimento 5), indicando que os resultados obtidos não foram influenciados por alterações na atividade locomotora dos animais.

Quando foi avaliado, no experimento 3, o efeito da administração intra-HD de DOI, agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}, não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa dos comportamentos avaliados. Por tratar-se de um agonista menos seletivo para os receptores 5-HT_{2C} em relação aos receptores 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}/K_i = 0,93 nmol, 5-HT_{2C}/K_i = 8,31 nmol; KNIGHT et al., 2004), a ausência de efeito pode decorrer da ativação também desses últimos receptores.

Quanto ao estudo do bloqueio dos receptores 5-HT_{2C}, os resultados obtidos no experimento 4, em decorrência da injeção intra-HD de SB-242084, revelam uma facilitação da aquisição da resposta de esquiva inibitória, caracterizando efeito do tipo ansiogênico, também sem alteração da resposta de fuga. Vale ressaltar que este resultado observado no LTE não está relacionado à alteração na atividade locomotora, uma vez que o tratamento não modificou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto.

Para fins comparativos, os efeitos dos tratamentos utilizados também foram avaliados no teste do beber punido de Vogel (experimentos 6, 7 e 8). Esse teste de conflito tem sido associado a respostas defensivas relacionadas ao transtorno de ansiedade generalizada (GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; MILLAN; BROCCO, 2003), assim como a resposta de esquiva inibitória gerada no LTE.

Desse modo, os resultados obtidos nesse modelo também sugerem efeito do tipo ansiolítico, mediante a ativação dos receptores 5-HT_{2C}, e efeito ansiogênico decorrente da administração do antagonista, corroborando os achados em relação à esquiva inibitória do LTE. Mais especificamente tanto a administração intra-HD de MK-212 quanto de RO-600175, resultaram em aumento no número de lambidas punidas, caracterizando efeito do tipo ansiolítico, enquanto que a microinjeção de SB-242084 promoveu efeito oposto. Os tratamentos utilizados não apresentaram efeitos inespecíficos sobre a ingestão de água, como evidenciado nos experimentos 9 e 10.

A literatura atual mostra-se escassa no que diz respeito ao estudo da participação dos receptores 5-HT_{2C} do HD na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade, destacando-se apenas alguns estudos utilizando agonistas desses receptores.

Neste sentido, Whitton e Curzon (1990), utilizando injeção intra-HD do agonista de receptores 5-HT_{2B/2C}, m-CPP, demonstraram efeito do tipo ansiogênico em ratos avaliados no teste de interação social. Em contrapartida, outro estudo conduzido utilizando a mesma manipulação farmacológica, porém em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado, não observou alterações na expressão das respostas defensivas evocadas nesse modelo (CORNÉLIO; NUNES DE SOUZA, 2007).

A divergência entre estes estudos e nossos resultados pode decorrer da utilização de diferentes espécies e também a avaliação em diferentes modelos de ansiedade (GRIEBEL, 1995; TRIET et al., 1993). Além disso, estes se diferenciam da presente investigação por utilizarem um agonista menos seletivo para os receptores 5-HT_{2C}. Assim, o m-CPP possui expressiva afinidade por outros receptores serotoninérgicos, além dos receptores 5-HT_{2C} (5-HT_{2C}/K_i = 14,1 nmol, 5-HT_{2B}/K_i = 40,74 5-HT_{2A}/K_i = 54,95; KNIGHT et al., 2004) e adicionalmente, pode também se ligar a receptores noradrenérgicos e dopaminérgicos (HAMIK; PEROUTKA, 1989).

Porém, mesmo utilizando injeção intra-HD de MK-212, Alves e colaboradores (2004) também não observaram alterações nas repostas expressas por ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. A seletividade da manipulação dos receptores 5-HT_{2C} do HD em alterar apenas a resposta de esquiva inibitória apontada na presente investigação, talvez não tenha sido observada por Alves e colaboradores (2004) pela inespecificidade do modelo utilizado. O labirinto em cruz elevado é um teste que evoca respostas defensivas mistas, sendo que o animal realiza diferentes estratégias de defesa enquanto explora o labirinto, podendo, por exemplo, se esquivar dos espaços abertos ou, estando nesses, fugir para um dos

espaços fechados (HANDLEY et al.; 1993). Derivado do labirinto em cruz elevado, o LTE, foi desenvolvido com a finalidade de separar a expressão das respostas de esquiva inibitória e fuga (GRAEFF, 2004).

No que diz respeito à injeção intra-HD do antagonista SB-242084, o fato de o tratamento ter promovido resposta ansiogênica nos dois modelos testados, indica que a droga pode ter se comportado como um agonista inverso, um modo de ação já relatado para esta droga (ALOYO et al., 2009).

Uma outra possível explicação para esse achado seria a existência de uma liberação tônica de serotonina no HD, inibindo comportamentos relacionados à ansiedade. Porém, a desinibição seletiva de neurônios serotoninérgicos do NMR, principal fonte de inervação para o HD, promove efeito do tipo ansiogênico sobre a resposta de esquiva inibitória que, além disso, é bloqueado pela injeção intra-HD de WAY-100635, antagonista de receptores 5-HT_{1A}, demonstrando ser esse último receptor um mediador da resposta ansiogênica observada (DOS SANTOS; ANDRADE; ZANGROSSI, 2008).

Outra possibilidade é que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2C} pode ter alterado uma possível atividade constitutiva desses receptores na região investigada. A atividade constitutiva, que pode ser descrita como a capacidade do receptor em regular sistemas de sinalização celular na ausência de um ligante, é característica demonstrada dos receptores 5-HT_{2C}, principalmente em estudos *in vitro* (ALOYO et al., 2009; BERG et al., 2005).

Em recente estudo da participação dos receptores 5-HT_{2C} do núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA), na mediação das respostas geradas no LTE, Vicente e Zangrossi (2012) obtiveram efeito após a microinjeção do antagonista SB-242084, porém esse efeito, também observado somente sobre a

resposta de esquiva inibitória, foi do tipo ansiolítico, oposto ao observado na presente investigação.

De fato, ao analisarem-se a participação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por receptores 5-HT_{2C} nas respostas defensivas expressas por ratos submetidos ao LTE, em outras estruturas límbicas, pode-se notar que os efeitos decorrentes da ativação e do bloqueio desses receptores parecem ser estrutura dependentes, todavia, em conjunto indicam alteração seletiva da resposta de esquiva inibitória.

Assim, em concordância com os resultados aqui observados, a injeção intra-hipotálamo ventromedial de MK-212, prejudicou a resposta de esquiva inibitória, sugerindo efeito ansiolítico, sem alterar a resposta de fuga (DA SILVA et al., 2011). O estudo não avaliou efeito da injeção de antagonistas destes receptores.

Por outro lado, a injeção intra-substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) (YAMASHITA; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011) ou intra-BLA (VICENTE; ZANGROSSI, 2012) do mesmo agonista promoveu efeito oposto (ansiogênico) apenas sobre essa mesma resposta. A injeção intra-BLA de SB-242084 resultou em efeito, como já mencionado (VICENTE; ZANGROSSI, 2012), porém a injeção do mesmo antagonista intra-SCPd não afetou as respostas mensuradas no LTE (YAMASHITA; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011).

Muito embora os dois últimos resultados descritos apontem para direções distintas, quando confrontados com achados do presente estudo, ambos guardam a mesma relação de oposição com a ativação dos receptores 5-HT_{1A} nas estruturas investigadas. Assim, a ativação desses últimos receptores com a injeção intra-BLA (STRAUSS, 2005) ou intra-SCPd de 8-OHDPAT produz efeito do tipo ansiolítico sobre a resposta esquiva inibitória no LTE (ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI,

2003), enquanto que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} em ambas as estruturas promove efeito do tipo ansiogênico na expressão desta resposta (YAMASHITA; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011; VICENTE; ZANGROSSI, 2012). De maneira inversa, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} do HD produz efeito do tipo ansiogênico (DOS SANTOS; ANDRADE; ZANGROSSI, 2008), e a ativação de 5-HT_{2C} efeito do tipo ansiolítico, como demonstrado no presente estudo.

A seletividade em alterar apenas a resposta de esquia inibitória, além de parecer comum no estudo da participação dos receptores 5-HT_{2C} nas respostas observadas no LTE, também parece manter-se em outras manipulações no HD. Assim, ao avaliarem o efeito da injeção intra-HD do benzodiazepínico midazolam em ratos testado no LTE, Casarotto e colaboradores (2012), observaram prejuízo somente sobre a resposta de esquia inibitória.

Esta observação vai ao encontro da proposição que traz o hipocampo como estrutura criticamente envolvida na fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada (MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

Nessa mesma direção, estão estudos envolvendo o NMR, principal fonte de inervação serotoninérgica para o HD. A desinibição dos neurônios serotoninérgicos desse núcleo, com a injeção de WAY-600135, antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, facilitou a aquisição da resposta de esquia inibitória sem alterar a resposta de fuga, de animais submetidos ao LTE (DOS SANTOS; ANDRADE; ZANGROSSI, 2005).

Adicionalmente, animais submetidos à esquia inibitória do LTE, mas não à fuga, apresentam aumento da atividade dos neurônios serotoninérgicos do NMR, demonstrado pelo aumento da dupla imunomarcagem para proteína *Fos* e triptofano hidroxilase, respectivamente marcadores de ativação neuronal e neurônios serotoninérgicos (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012).

Em conjunto, os resultados sugerem que os receptores 5-HT_{2C} do HD participam da resposta de esquiva inibitória gerada no LTE, guardando correlação inversa com os receptores 5-HT_{1A} sobre essa mesma resposta. Além disso, os achados estendem a importância dos receptores 5-HT_{2C} e dessa porção hipocampal na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade generalizada.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que os receptores do tipo 5-HT_{2C} do hipocampo dorsal estão envolvidos na modulação de comportamentos defensivos relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada, mas não ao transtorno do pânico.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALOYO, V.J.; BERG, K.A.; SPAMPINATO, U.; CLARKE, W.P.; HARVEY, J.A. Current status of inversive agonism at serotonin 2A (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacol Ther*, 121: 160-173, 2009.
- ALVES, S.H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A.P. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT(2C) agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol*, 15: 37-43, 2004.
- 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. 4th edition, text revision. Washington, DC, 2004.
- 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*, 264:259-264, 1994.
- ARGYROPOULOS, S.V.; SANDFORD, J.J.; NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part2: Pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacol Ther*, 88(3):213-227. Review, 2000.
- 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
- BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8):1083-1152, 1999.
- BERG, K.A.; HARVEY, J.A.; SPAMPINATO, U.; CLARKE, W.P. Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 26(12):625-630, 2005.
- BERTOGLIO, L.J.; JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav. Brain Res*. 175:183-188, 2006.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*, 39: 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*, 103: 70-82, 1989.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G. BLANCHARD, R.J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol*, 463: 97-116, 2003.

- BLANCHARD, 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, D.C.; HYND, A.L.; MINKE, K.A.; BLANCHARD, R.J. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci Biobehav Rev*, 25: 761-770, 2001.
- BLANCHARD, R.J.; NIKULINA, J.N.; SAKAI, R.R.; MCKITTRICK, C.; MCEWEN, B., BLANCHARD, D.C. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav*, 63(4):561-9, 1998.
- 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.
- BOCKAERT, J.; CLAEYSEN, S.; DUMUIS, A.; MARIN, P. Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors. In: MULLER, C.P.; JACOBS, B.L. (Ed.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*, San Diego: Elsevier, 2010. p. 102-122.
- BURNS, C.M.; CHU, H.; RUETER, S.M.; HUTCHINSON, L.K.; CANTON, H.; SANDERS-BUSH, E.; EMESON, R. Regulation of serotonin- 2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*, 387(6630):303-308, 1997.
- CAMPBELL, B.M.; MERCHANT, K.M. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res*, 993:1-9, 2003.
- CASAROTTO, P.C.; DE BORTOLI, V.C.; ZANGROSSI, H. JR. Intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor increases anxiety-related, but not panic-related defensive responses: involvement of serotonin. *Behav Pharmacol*, 23(1):80-88, 2012.
- 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. *Neuropharmacology*, 39:123-132, 2000.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 178(1):82-89, 2007.
- DA SILVA, E.S.; POLTRONIERI, S.C.; NASCIMENTO, J.O.; ZANGROSSI, H. JR; VIANA M.B. Facilitation of 5-HT(2A/2C)-mediated neurotransmission in the ventromedial hypothalamic nucleus decreases anxiety in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*, 216(2):692-698, 2011.
- DARWIN, C.A. A expressão das emoções nos homens e nos animais. Tradução de Garcia LSL. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5 HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol*, 5: 305-315, 1991.
- DEAKIN J.F.; SIMPSON, M.D.; SLATER, P.; ROYSTON, M.C. Social signaling and schizophrenia: the significance of neurochemical and morphological abnormalities of the basolateral circuit. *Clin Neuropharmacol*, 15 Suppl 1 Pt A:495A-497A, 1992.

- DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septohippocampal system. *Brain Res*, 1001:60-71, 2004.
- 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, T.G.C.S.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology (Berl.)*, 179: 733-741, 2005.
- 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. *European Neuropsychopharmacology*, 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.
- EISON, A.S.; EISON, M.S.; YOCCA, F.D.; GIANUTSOS, G. Effects of imipramine and serotonin-2 agonists and antagonists on serotonin-2 and beta-adrenergic receptors following noradrenergic or serotonergic denervation. *Life Sci*, 44(19):1419-1427, 1989.
- ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behavioural Pharmacology*, 18:365-374. Review. 2007.
- ENGIN, E.; TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32(6):1399-1419, 2008.
- ENGLANDER, M.T.; DULAWA, S.C.; BHANSALI, P.; SCHMAUSS, C. How stress and fluoxetine modulate serotonin 2C receptor pre-mRNA editing. *J Neurosci*, 25: 648-651, 2005.
- FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci*, 16:4810-4815, 1996.
- FITZGERALD, L.W.; IYER, G.; CONKLIN, D.S.; KRAUSE, C.M.; MARSHALL, A.; PATTERSON, J.P.; TRAN, D.P.; JONAK, G.J.; HARTIG, P.R. Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor. *Neuropsychopharmacology*, 2 (Suppl), 83S-90S, 1999.
- GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of "conflict" behavior. *Eur J Pharmacol*, 9: 319-324, 1970.
- GIORGETTI, M.; TECOTT, L. Contributions of 5-HT_{2C} receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur J Pharmacol*, 488: 1-9, 2004.
- GONZALEZ, L.E.; OUAGAZZAL, A.M.; FILE, S.E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *Eur J Neurosci*, 10:3673-3680, 1998.
- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense system. *Braz J Med Biol Res*, 14:239-265, 1981.

- GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS G.D.; ROTH, M.; NOYES, R (Ed.). *Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. v. 3. p. 307-354.
- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev Neurosci*, 4(2):181-211, 1993.
- 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, 1999. p.135-178.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr*, Suppl 2:42-45, 2003.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(3):239-59, 2004.
- GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. Neurobiologia. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF F.G. (Ed). *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Ateneu, 2004. p. 107-132.
- GRAEFF, F.G.; NETO, C.F.; ZANGROSSI, H. JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 237-246, 1998.
- GRAEFF, F.G.; SHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther*, 173: 277-283, 1970.
- GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res*, 26: 67-70, 1993.
- GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 21: 791-799, 1997.
- GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI Jr., H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H.; den BOER, J.A.; WESTENBERG, H. and WILLNER, P. (Ed.) *Textbook of biological psychiatry*. Londres: Wiley and Sons, 2002. p. 879-893.
- 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. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 10(3):207-217, 2010.
- GRAY, J. A. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press, 1982.
- GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hipocampal system. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- GRIEBEL G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther*, 65(3):319-395. Review. 1995.
- GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT₂ receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacol*, 36: 793-802, 1997.

- GUREVICH, I.; ENGLANDER, M.T.; ADLERSBERG, M.; SIEGAL, N.B.; SCHMAUSS, C. Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J Neurosci*, 22(24): 10529-10532, 2002a.
- GUREVICH, I.; TAMIR, H.; ARANGO, V.; DWORK, A.; MANN, J.J.; SCHMAUSS, C. Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron*, 43: 349-356, 2002b.
- HAMIK A.; PEROUTKA, S.J. 1-(m-chlorophenyl)piperazine (mCPP) interactions with neurotransmitter receptors in the human brain. *Biol Psychiatry*, 25(5):569-75, 1989.
- HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W.; CRITCHLEY, M.A.; NJUNG'E, K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res*, 58(1-2):203-210, 1993.
- 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.
- HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepines and serotonergic effects on punished responding but not discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*, 92: 491-504, 1987.
- 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.
- IRVINE, E.E.; CHEETA, S.; LOVELOCK, C.; FILE, S.E. Tolerance to midazolam's anxiolytic effects after short-term nicotine treatment. *Neuropharmacology*, 40(5):710-716, 2001.
- JENCK, F.; BROEKKAMP, C.L.; VAN DELFT, A.M. 5-HT_{1C} receptors in the serotonergic control of periaqueductal gray induced aversion in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 100(3):372-376, 1990.
- JOLAS, T.; SCHREIBER, R.; LAPORTE, A.M.; CHASTANET, M.; DEVRY, J.; GLASER, T.; ADRIEN, J.; HAMON, M. Are postsynaptic 5-Ht_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-Ht_{1A} a receptor agonists and in their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 272:920-929, 1995.
- KISER, R.S.; J.R.; BROWN, C.A.; SANGHERA, M.K.; GERMAN, D.C.; Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior. *Brain Res*, 2;191(1):265-272, 1980.
- KNIGHT, A.R.; MISRA, A.; QUIRK, K.; BENWELL, K.; REVELL, D.; KENNETT, G.; BICKERDIKE, M. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 370(2):114-123, 2004.
- MACLEAN, P.D. Psychosomatic disease and the visceral brain: recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med*, 11:338-353, 1949.

- MCKENNA J.T.; VERTES, R.P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res Bull*, 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.
- MCQUADE, R.; SHARP, T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem*, 69(2):791-796, 1997.
- MENARD, J.; TREIT, D. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behav Pharmacol*, 9:93–101, 1998.
- MENARD, J.; TREIT, D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. *Brain Res*, 888:163–166, 2001.
- MENGOD, G.; CORTE´S, R.; VILARO´, M.T.; HOYER, D. Distribution of 5-HT receptors in the central nervous system. In: MULLER, C.P.; JACOBS, B.L. (Ed.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*, San Diego: Elsevier, 2010, p 123-39.
- MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 70: 83-244, 2003.
- MILLAN, M.J. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Pharmacologie*, 60: 441-460, 2005.
- MILLAN, M.J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur J Pharmacol*, 463, 67–96, 2003.
- MOSER, M.B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8, 608–619, 1998.
- NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT Receptor Subtypes in the Modulation of Dorsal Periaqueductal Gray Generated Aversion. *Pharmacol Biochem Behav*, 52: 1-6, 1995.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Oxford University Press; 1978. p 570.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed., San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.
- PELOSI, G.G.; RESSTEL, L.L.; SOARES, V.P.; ZANGROSSI, H. JR.; GUIMARÃES, F.S.; CORRÊA, F.M. Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Behav Pharmacol*, 20 (3): 252–259, 2009.
- PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R.J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci*, 23:2185–2196, 2006.
- POMPEIANO, M.; PALACIO, J.M.; GENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Molecular Brain Research* 23:163-178, 1994.

- QUIRK, K.; LAWRENCE, A.; JONES, J.; MISRA, A.; HARVEY, V.; LAMB, H.; REVELL, D.; PORTER, R.H.P.; KNIGHT, A.R. Characterisation of agonist binding on human 5-HT_{2C} receptor isoforms. *Eur J Pharmacol*, 419: 107-112, 2001.
- REZAYAT, M.; ROOHBAKHSH, A.; ZARRINDAST, M.R.; MASSOUDI, R.; DJAHANGUIRI, B. Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiol. Behav.* 84:775-782, 2005.
- SCHREIBER, R.; DEVRY, 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*, 249:341-351, 1993.
- SHUHAMA, R.; DEL-BEN, C.M.; LOUREIRO, S.R.; GRAEFF, F.G. Defensive responses to threat scenarios in Brazilians reproduce the pattern of Hawaiian Americans and non-human mammals. *Braz J Med Biol Res*, 41(4):324-332, 2008.
- 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.
- SPIACCI, A. JR; COIMBRA, N.C.; ZANGROSSI, H. JR. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience*, 2012. In press.
- STRAUSS, C.V.A. Efeitos da ativação de receptores serotoninérgicos dos tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/C} do complexo amigdalóide sobre a modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico. 2005. 144 f. Tese (Doutor em Ciências)-Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- TREIT D.; ROBINSON, A.; ROTZINGER, S.; PESOLD, C. Anxiolytic effects of serotonergic interventions in the shock-probe burying test and the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res*, 54(1):23-34, 1993.
- TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI, H. JR; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 65: 571-576, 2000.
- TYE, N.C.; EVERITT, B.J.; IVERSEN, S.D. 5-Hydroxytryptamine and punishment. *Nature*, 268: 741-743, 1977.
- VAN OEKELLEN, D.; LUYTEN, W.H.; LEYSEN, J.E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci*, 72(22):2429-2449, 2003.
- VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 17;407(4):555-582, 1999.
- VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 549-554, 1994.
- VICENTE, M.A.; 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.
- 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.

- WHITTON, P.; CURZON, G. Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) into the hippocampus. *Psychopharmacology*, 100:138-140, 1990.
- WERRY, T.D.; LOIACONO, R.; SEXTON, P.M.; CHRISTOPOULOS, A. RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signaling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther*, 119: 7-23, 2008.
- WISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, 177: 180-183, 1972.
- WITTER, M.P. Hippocampus and Related Structures. In: SMELSER, N.J.; BALTES, P.B. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences. London, Pergamon, 2001. p 6711-6718.
- WITTER, M.P.; GROENEWEGEN, H.J.; LOPES DA SILVA, F.H.; LOHMAN, A.H. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol*, 33(3):161-253, 1989.
- YAMASHITA, P.S.M.; DE BORTOLI, V.C.; ZANGROSSI, H.JR. 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology*, 60(2-3):216-222, 2011.
- ZANGROSSI, H.JR; GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull*, 44: 1-5, 1997.
- ZANGROSSI, H.JR.; GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Ateneu, 2004. p 55-73.
- ZANGROSSI, H. JR; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF F.G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(7-8):637-645. Review. 2001.
- ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol*, 25: 153-161, 2003.