

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

**Envolvimento de receptores 5-HT<sub>2A</sub> da substância cinzenta  
periaquedutal dorsal no medo condicionado e incondicionado de  
ratos**

**Luciana Chrystine Oliveira**

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

Ribeirão Preto

2007

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

**Envolvimento de receptores 5-HT<sub>2A</sub> da substância cinzenta  
periaquedutal dorsal no medo condicionado e incondicionado de  
ratos**

**Luciana Chrystine Oliveira**

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

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão**

Ribeirão Preto

2007

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

### FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Luciana Chrystine

Envolvimento de receptores 5-HT<sub>2A</sub> da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal no medo condicionado e incondicionado de ratos

89 p.; il.; 30 cm.

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

Orientador: Brandão, Marcus Lira.

1. Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal. 2. Medo Incondicionado. 3. Estimulação Elétrica. 4. Medo Condicionado Contextual. 5. Receptores 5-HT<sub>2A</sub>. 6.  $\alpha$ -metil-serotonina. 7. Cetanserina.

*Sinônimo de inocência, alegria e esperança. No início tudo parecia assustador diante do novo, mas no momento em que o peguei em meus braços todas as angústias se tornaram insignificantes diante da magia da vida e então tive a certeza de que eras um anjo de Deus em minha vida. Peço perdão por muitas vezes ter me ausentado, afinal de contas, a caminhada nem sempre foi fácil.*

*À você filho...*

*dedico toda minha vida!!!*

*À minha mãe, Cleuse  
pelo seu apoio incondicional  
Seria difícil encontrar palavras para agradecer  
tudo que você fez por mim, por nós.  
Por tudo que sou...*

*Te amo mãe!!!*

*Aos meus irmãos, Marco Aurélio e Márcia Regina,  
pela nossa amizade ... jóia rara!  
Por sempre acreditarem que eu seria capaz*

*Amo vocês!!!*

## AGRADECIMENTOS

*“Até aqui nos ajudou o Senhor”*

1 Sm, 7, 12

*Acima de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades colocadas em meu caminho!*

*Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, exemplo de orientação e profissionalismo. Pelos seus conselhos valiosos, sempre com muita motivação. Obrigada por ter aberto as portas para mim. À você professor, meus sinceros agradecimentos.*

*Ao Prof. Dr. Jesus Landeira Fernandes por sua assessoria e contribuições valiosas para o enriquecimento deste trabalho.*

*Às professoras Leda Menescal Oliveira, Chrystie Ramos Andrade Leite Panissi e Cláudia Maria Padovan pela atenção e importantes sugestões na qualificação que ajudaram a enriquecer este trabalho.*

*À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura desta tese.*

*Ao Ricardo, ou melhor, ao Pancinha. Apesar de estarmos indo contra tudo o que é convencional, eu acredito que tudo aquilo que é feito com amor, e por amor, não tem como dar errado. Obrigada por você ter sido muito mais que um pai, por ter sido companheiro, responsável e acima de tudo, um grande amigo. Sem a sua ajuda, com certeza, esta etapa não seria possível, portanto, esta conquista também é sua. Obrigada por tudo!*

*À Giovanna por apoiar meu irmão sempre e pelos presentes: Tiago e Davi. Apesar de distantes, vocês tornaram esta etapa muito especial e alegre. Obrigada pelo carinho de vocês.*

*Ao meu pai, Tobias, que mesmo distante nunca deixou de me apoiar e acreditar em mim.*

*Aos amigos deste laboratório, são tantos ... Obrigada pelo convívio, carinho e os momentos preciosos de muita alegria, companheirismo e descontração. Nossos cafés ficaram guardados pra sempre em minha memória. Obrigada a todos vocês pelo carinho e pelas ajudas indispensáveis.*

*Ao Jorge pelas inúmeras vezes que me socorreu com os experimentos.*

*Aos amigos, antigos e novos, da moradia da pós - graduação. Obrigada pelo carinho e pelos momentos de descontração.*

*À Renata BV, pela sua ajuda indispensável.*

*Aos Funcionários da Psicobiologia.*

*À Secretaria da pós – graduação.*

*Ao CNPq, pelo apoio financeiro.*

*A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

***Muito Obrigada!***

*RESUMO*



Sabe-se que o medo condicionado contextual (MCC) pode ativar diversas áreas mesencefálicas, como a Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPd). Diversos estudos avaliaram como mecanismos serotoninérgicos modulam o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPd. Uma função proeminente dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> é regular estados aversivos induzidos pela ativação da SCPd e, apesar de saber que experiências aversivas prévias exercem um importante papel em determinados tipos de ansiedade, somente estudos com estimulação da SCPd de ratos sem experiência aversiva prévia foram conduzidos até o momento. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel funcional dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> localizados nos substratos neurais da aversão na SCPd de ratos previamente submetidos ao condicionamento contextual aversivo. Foram avaliadas as respostas de congelamento e fuga obtidas a partir do procedimento de estimulação elétrica da SCPd na sessão teste, realizada 24 horas após o condicionamento, quando os animais foram recolocados no contexto previamente pareado com choques nas patas ou no contexto diferente. A função dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> da SCPd foi avaliada pela injeção local de  $\alpha$ -metil-serotonina ou cetanserina, agonista e antagonista seletivos de receptores do tipo 5-HT<sub>2A</sub>, respectivamente. De acordo com estudos anteriores, a  $\alpha$ -metil-serotonina aumentou os limiares aversivos (efeito antiaversivo) determinados pela estimulação da SCPd em animais ingênuos, enquanto que a injeção de cetanserina não produziu qualquer efeito significativo. No presente estudo, a cetanserina reduziu o limiar de congelamento (efeito proaversivo), enquanto que a  $\alpha$ -metil-serotonina continuou apresentando efeito antiaversivo em animais com experiência aversiva prévia (choques nas patas). Estes resultados sugerem que experiências aversivas anteriores podem produzir importantes alterações na função sináptica dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> da SCPd, podendo refletir na reatividade da SCPd à sua estimulação aversiva.

**Palavras-chave:** receptores 5-HT<sub>2A</sub>, substância cinzenta periaquedutal dorsal, cetanserina,  $\alpha$ -metil-serotonina, medo incondicionado, medo condicionado contextual.

*ABSTRACT*

---

It has been shown that contextual fear conditioning (CFC) may activate brainstem regions such as the dorsal periaqueductal gray (dPAG). Several studies have been carried out to disclose how 5-HT<sub>2</sub> mechanisms modulate the aversive stimulation of the dPAG. One prominent function of 5-HT<sub>2</sub> receptors is to regulate the aversive states induced by activation of the dPAG. However, in spite of the notion that past stressful experiences play a crucial role in certain types of anxiety only studies with stimulation of the dPAG of rats without previous aversive experience have been conducted so far. We investigated the mediation of 5-HT<sub>2</sub> receptors located in the neural substrates of aversion of the dPAG in rats previously submitted to CFC. Defensive behaviors induced by activation of the dPAG were assessed by measuring the lowest intensity of electric current applied to this structure (threshold) able to produce freezing and escape responses during testing sessions of CFC, in which animals were placed in a context previously paired to footshocks. The 5-HT<sub>2</sub> function of the dPAG in this condition was evaluated by local injections of  $\alpha$ -methyl-5-HT and ketanserin, selective agonist and antagonist of 5-HT<sub>2</sub> receptors, respectively. In accordance with previous studies,  $\alpha$ -methyl-5-HT increased the aversive thresholds (antiaversive effects) determined by stimulation of the dPAG in naive rats and injection of ketanserin into the dPAG did not produce any significant effects. On the other hand, ketanserin decreased the freezing threshold (proaversive effect) determined by the dPAG electrical stimulation while  $\alpha$ -methyl-5-HT continued to show antiaversive effects in animals with prior experience with foot shocks. The present results suggest that a past stressful experience can produce changes in the synaptic function of 5-HT<sub>2</sub> receptors within the dPAG with important impact on the defensive behaviors induced by electrical stimulation of this area. **Key words: 5-HT receptors, dorsal periaqueductal gray, ketanserin,  $\alpha$ -methyl 5-HT, unconditioned fear, contextual fear conditioning.**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Medo</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Medo Condicionado e Medo Incondicionado</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Substância Cinzenta Periaquedutal</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Mecanismos serotoninérgicos e receptores 5-HT<sub>2A</sub></b> .....	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Geral.</b> .....	<b>25</b>
<b>2. Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3. EXPERIMENTO 1</b> .....	<b>26</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>1. Animais</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Cirurgia</b> .....	<b>28</b>
<b>3. Equipamentos</b> .....	<b>29</b>
<b>4. Drogas</b> .....	<b>30</b>
<b>5. Procedimento</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Histologia</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Análise Estatística</b> .....	<b>33</b>
<b>8. Delineamento Experimental</b> .....	<b>33</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4. EXPERIMENTO 2</b> .....	<b>38</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>1. Animais</b> .....	<b>40</b>
<b>2. Cirurgia</b> .....	<b>40</b>

<i>3. Equipamentos</i> .....	<b>40</b>
<i>4. Drogas</i> .....	<b>41</b>
<i>5. Procedimento</i> .....	<b>42</b>
<i>6. Histologia</i> .....	<b>43</b>
<i>7. Análise Estatística</i> .....	<b>43</b>
<i>8. Delineamento Experimental</i> .....	<b>44</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>

## *INTRODUÇÃO*



## **1. Medo**

O medo faz parte de um complexo repertório de comportamentos inatos espécie-específicos, fundamental para a sobrevivência dos indivíduos na natureza. Os circuitos neurais envolvidos na organização destas respostas defensivas dos animais em situações de perigo vêm sendo selecionados ao longo de todo o processo evolutivo. Através da seleção natural, indivíduos com respostas defensivas de maior valor adaptativo foram capazes de enfrentar as ameaças presentes no seu habitat natural e transmitir suas características adaptativas aos seus descendentes.

Do ponto de vista biológico a ansiedade possui suas raízes nas reações de defesa dos animais, verificadas em resposta aos perigos comumente encontrados no ambiente em que vivem. Assim, quando um animal confronta-se com uma ameaça ao seu bem estar, à sua integridade física ou a sua própria sobrevivência, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Tal ameaça pode ser representada por um estímulo inato, como um predador ou um agressor da mesma espécie, ou por estímulos neutros, que por associação repetida com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

De acordo com Davis *et al.* (1997) o medo é provocado por um estímulo ameaçador e claramente identificável e cessa logo após o término do estímulo eliciador. Já a ansiedade não se encontra claramente associada a um único estímulo provocador, ocorre em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, havendo, portanto um componente de incerteza. Além disso, perdura por longo tempo, e depois de certo ponto seu significado adaptativo é duvidoso (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

Diversos estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade demonstraram que a natureza das respostas de medo em animais expostos a situações ameaçadoras depende da

intensidade e da distância do estímulo aversivo. Estímulos ameaçadores potenciais ou distantes induzem aumento das respostas de avaliação de risco, postura alerta e vigilante, e quando o perigo é explícito, porém distante, o animal assume uma postura imóvel com inibição da atividade motora, além de reações autonômicas e neurovegetativas características da resposta de congelamento. Assumindo esta postura de congelamento, o animal pode não ser percebido pelo predador. Porém, à medida que o predador se aproxima, ou aumenta a intensidade dos sinais que indicam sua presença, o comportamento de defesa se altera de um congelamento intenso para um comportamento de luta ou fuga, quando esta é possível (BRANDÃO et al., 2003).

Apesar de o comportamento defensivo variar de uma espécie para outra, algumas estratégias comportamentais são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais os animais se deparam na natureza. Geralmente, estas respostas defensivas são acompanhadas de intensas alterações autonômicas como dilatação da pupila, piloereção, micção, defecação, exoftalmia, aumento da vigilância e atenção, alteração da frequência respiratória e cardíaca, alteração da pressão sanguínea, aumento da irrigação sanguínea dos músculos esqueléticos, que dão ao indivíduo o suporte fisiológico necessário ao desempenho motor na reação de defesa (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

## ***2. Medo Condicionado e Medo Incondicionado***

Está bem estabelecido na literatura que os ratos congelam, esquivam e têm respostas defensivas a odores de predadores. Essas características são indicadoras de medo incondicionado, ou seja, quando um estímulo incondicionado de natureza aversiva, como um predador, desencadeia no animal uma resposta inata (por exemplo, o congelamento ou fuga) (CATTARELLI; CHANEL, 1979; BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BERTON et al., 1998; WALLACE; ROSEN, 2001). A microinjeção de drogas que diminuem a

neurotransmissão gabaérgica, bem como a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal desencadeiam comportamento de congelamento alternado por corridas e saltos aparentemente não-direcionados (BRANDÃO et al., 1982; SCHMITT et al., 1984). Esta reação encontra similaridades ao que ocorre nos ataques de pânico apresentado em seres humano (BRANDÃO et al., 2005).

A resposta de medo condicionado mais estudada é o comportamento de congelamento. Este pode ser definido como a imobilidade total acompanhada de postura tensa (FANSELOW, 1984). Apresenta um complexo padrão comportamental, com alterações autonômicas, como aumento da atividade respiratória, hipertensão, aumento da frequência cardíaca, aumento da defecação e micção (FANSELOW; BOLLES, 1979; FANSELOW; BAACKES, 1982; FANSELOW, 1984; AVANZI et al., 1998; ANTONIADIS; MCDONALD, 1999; CARRIVE et al., 2000; CARRIVE, 2002).

Esta resposta condicionada é obtida através do condicionamento pavloviano, no qual um estímulo neutro (luz, som, ou contexto, por exemplo) é pareado com um estímulo incondicionado de natureza aversiva, como choque elétrico nas patas. Após esse pareamento, a apresentação do estímulo, que inicialmente era neutro, prediz a ocorrência do choque elétrico e então passa a atuar como um estímulo condicionado, desencadeando uma resposta condicionada, no caso o congelamento condicionado (FENDT; FANSELOW, 1999). Dessa forma, a luz, o som ou o contexto adquire significado por terem sido pareados com um estímulo incondicionado intrinsecamente aversivo. A aprendizagem é avaliada, portanto, pela capacidade com que a presença apenas do estímulo condicionado produz resposta condicionada em antecipação à ocorrência do estímulo incondicionado (GEWIRTZ; DAVIS, 2000).

Fanselow (1980) demonstrou que o tempo da resposta de congelamento é predominantemente determinado pelas características do choque e pela intensidade e/ou

duração do mesmo. Além disso, o tipo de estímulo condicionado também pode interferir no tempo de resposta exibida pelos animais, ou seja, se for um estímulo discreto, como a luz ou o som, a duração da resposta é menor (SAKAGUCHI et al., 1983). Porém, quando os estímulos são contextuais, o tempo da resposta de congelamento pode ultrapassar 40 minutos, dependendo da duração das sessões de condicionamento (FANSELOW, 1980; SAKAGUCHI et al., 1983; LEDOUX et al., 1988; ANTONIADIS; MCDONALD, 1999; CARRIVE, 2002; SILVA et al., 2004).

Muitos estudos têm sido realizados no sentido de identificar os circuitos neurais envolvidos na organização das respostas defensivas adotadas pelos animais. À medida que os estímulos ameaçadores, potenciais e distais são substituídos por estímulos proximais de medo muito intensos, ocorre uma comutação dos circuitos neurais usualmente responsáveis pela produção de respostas condicionadas de medo para reações defensivas incondicionadas caracterizadas por baixo nível de regulação e organização que se assemelham aos ataques de pânico (BRANDÃO et al., 2003).

Várias estruturas do sistema nervoso central são acionadas na gênese e elaboração dessas estratégias defensivas (BRANDÃO et al., 1999). Os mecanismos neurais envolvidos nas respostas incondicionadas de medo estão associados ao chamado sistema de fuga/luta ou Sistema Cerebral Aversivo (SCA), representado pelo hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e amígdala. A estimulação elétrica destas estruturas produz um padrão típico de respostas caracterizado por atividade motora intensa acompanhada de saltos, juntamente com reações neurovegetativas (BRANDÃO et al., 1994, 1999). Este conjunto de respostas caracteriza as reações de defesa que acompanham os estados aversivos característicos do medo e da ansiedade. Além destas estruturas, há evidências de que o colículo superior (processador de informações visuais) assim como o colículo inferior (plataforma importante das vias auditivas) estariam envolvidos neste sistema.

Além do sistema neural que organiza as respostas de medo inato existe outro sistema que organiza as respostas condicionadas de medo, o sistema de inibição comportamental (SInC). Este sistema foi proposto por Gray & McNaughton (2000) e tem como função principal detectar conflitos que possam surgir frente a um novo estímulo e tomar decisões diante destas situações, o que o torna fundamental na relação do indivíduo com o meio externo, conferindo a este sistema um alto valor adaptativo.

De acordo com estes autores, o SInC é composto por uma via serotoninérgica ascendente que se projeta para o Septo e o Hipocampo a qual pode estar implicada na gênese da inibição comportamental verificada em situações de perigo. Aferências noradrenérgicas provenientes do *Locus Coeruleus* na ponte e que se projetam para o septo e o hipocampo também estariam envolvidas neste sistema. O SInC responderia a eventos punitivos, estímulos novos e frustração condicionada através da supressão do comportamento operante mantido por recompensa ou, então, pela esquiva da punição (GRAY; McNAUGHTON, 2000).

Além das estruturas citadas acima, a amígdala também atuaria como responsável pelo componente afetivo do conflito, o que facilitaria o processo de armazenamento das informações, além do SInC, que se encarregaria do componente cognitivo (PHILLIPS; LEDOUX, 1992).

Outro tipo de resposta que vem sendo estudada é o comportamento de congelamento pós – estimulação da SCPd. Esta resposta, ao contrário do congelamento condicionado, não é contexto dependente. No congelamento condicionado a associação temporal entre o ambiente e o estímulo aversivo incondicionado é facilmente adquirida (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996; VIANNA et al., 2001a, b). Este último, mas não o primeiro, foi abolido por lesões da substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPv) (VIANNA et al., 2001c). Assim, os congelamentos condicionado e incondicionado parecem ter diferentes substratos neurais, os quais podem estar relacionados à ansiedade antecipatória e pânico, respectivamente. Enquanto

o congelamento condicionado parece estar associado ao SInC, o congelamento incondicionado gerado pela estimulação da SCPd pode estar relacionado ao sistema motivacional do pânico.

O congelamento incondicionado pode ser associado à SCPd e é dividido em dois componentes: o congelamento pré – fuga derivado da ativação de substratos neurais da aversão na SCPd, considerado como uma resposta preparatória para a fuga, e o congelamento pós – estimulação da SCPd que difere do primeiro, por ser associado ao processamento da informação aversiva que chega ao teto mesencefálico. A diferença mais marcante entre a resposta evocada pela estimulação da SCPd e o congelamento condicionado contextual com choques nas patas é que apenas um único choque nas patas age como estímulo incondicionado no procedimento de condicionamento contextual, enquanto que são necessárias várias estimulações da SCPd para que funcionem como estímulos incondicionados no medo condicionado contextual (CASTILHO et al., 2001). Similarmente, enquanto um ataque de pânico não é caracterizado como um distúrbio psiquiátrico, recorrentes ataques de pânico, associados a situações particulares e persistente preocupação com a ocorrência de outro ataque caracteriza o distúrbio do pânico que pode ter a SCPd como principal substrato envolvido.

### ***3. Substância Cinzenta Periaquedutal***

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura encefálica localizada no mesencéfalo, margeando o aqueduto cerebral. Rostralmente é contínua com a substância cinzenta periventricular localizada ao redor do 3º ventrículo no Hipotálamo. De acordo com alguns autores, a SCP apresenta quatro principais subdivisões designadas como colunas. São elas: coluna dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl) (BANDLER et al., 1991; CARRIVE, 1993).

Tem-se sugerido que a coluna ventrolateral medeia resposta de congelamento condicionado. A coluna lateral está relacionada ao comportamento de fuga vigorosa, respostas motoras e autonômicas (VIANNA et al., 2001a).

As colunas dorsolateral e dorsomedial juntas constituem a Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal. A Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPd) aparece como o principal substrato neural para a integração de estímulos aversivos que induzem respostas ativas de defesa no encéfalo.

Muitos estudos têm demonstrado o envolvimento da SCPd na coordenação dos diferentes aspectos da reação de defesa. Estimulações elétricas dessa estrutura eliciam respostas aversivas incondicionadas associadas com alterações autonômicas e sensoriais que ocorrem para dar suporte a comportamentos motores relacionados ao medo (BRANDÃO et al., 1982, 1990, 1999; LEÃO-BORGES et al., 1988; GRAEFF, 1990; COIMBRA; BRANDÃO 1997; VIANNA et al., 2001a). A aplicação de intensidades graduais de corrente elétrica na SCPd promove sequencialmente respostas de alerta, congelamento e fuga.

A natureza aversiva da estimulação elétrica da SCPd em ratos tem sido demonstrada em diversos experimentos nos quais eles aprendem a desligar o estímulo (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF, 2002, 2004; JENCK et al., 1995). Estas estratégias são expressas em condições naturais quando o predador está muito próximo ou em contato direto com a presa. Nestas condições o animal entra em congelamento. Alternativamente, ele foge se há uma saída. A estimulação da SCPd leva o animal a uma corrida intensa, alternada com períodos de imobilidade tensa ou congelamento (GRAEFF, 2004). Assim, a estimulação elétrica da SCPd tem sido considerada um modelo de ataque de pânico (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF, 2002, 2004; MAGIEREK et al., 2003).

O comportamento de congelamento induzido pela estimulação da SCPd é definido como uma imobilidade tensa acompanhada por exoftalmia e/ou defecação e micção

(BRANDÃO et al., 2003; MAGIEREK et al., 2003). É, portanto, diferente do congelamento que se observa em testes de medo condicionado. Nestes testes, os animais recebem choques elétricos nas patas e apresentam congelamento quando mais tarde voltam ao local onde receberam previamente os choques. Este tipo de aprendizado Pavloviano tem sido chamado de medo condicionado contextual (JENCK et al., 1995; MAGIEREK et al., 2003; VIANNA et al., 2001a, 2001b), um tipo de medo que é evocado quando um ambiente específico (ou contexto) é repetidamente pareado com um estímulo desagradável ou aversivo. Nos ratos essa resposta se caracteriza pelo congelamento, associado a um aumento da pressão sanguínea, aumento no ritmo cardíaco, micção, defecação e vocalizações ultrassônicas (LEMAN et al., 2003).

#### ***4. Mecanismos serotoninérgicos e receptores 5-HT<sub>2A</sub>***

A serotonina (5-hidroxitriptamina - 5-HT) é um importante neurotransmissor do Sistema Nervoso Central, que está envolvida na modulação de várias funções fisiológicas e comportamentais, tais como termorregulação, funções cardiovasculares, agressividade, comportamento sexual, medo, humor, apetite e ciclo sono-vigília.

Há evidências na literatura mostrando o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos na modulação do funcionamento do sistema cerebral aversivo, porém de uma maneira fásica, uma vez que a microinjeção de antagonistas de receptores serotoninérgicos não produziu qualquer efeito sobre os limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd. Estes achados contrastam com os efeitos aversivos observados com a microinjeção de compostos que bloqueiam os receptores GABA-A na SCPd (GRAEFF, 1990; 2002). Nesse sentido, os neurônios GABAérgicos exerceriam um controle inibitório tônico sobre os neurônios da SCPd, enquanto que as fibras serotoninérgicas exerceriam uma inibição fásica. Assim, o sistema serotoninérgico seria ativado somente na presença do estímulo

aversivo ou de um fator estressante, enquanto que a inibição tônica, exercida pelo sistema GABAérgico, corresponderia ao controle constante dos substratos neurais da aversão (BRANDÃO et al., 1982; NOGUEIRA; GRAEFF, 1995; GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

Castilho & Brandão (2001) mostraram que injeções intra – SCPd de cetanserina, um antagonista de receptores do tipo 5-HT<sub>2A</sub>, e metisergida, um antagonista não-seletivo de receptores 5-HT, não alteraram nem o congelamento, nem as respostas autonômicas de animais submetidos ao condicionamento aversivo obtido a partir do pareamento repetido de estímulos neutros (luz) com a estimulação elétrica da SCPd.

Quanto aos receptores serotoninérgicos envolvidos na regulação da aversão gerada na SCPd, as pesquisas apontam a participação do subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, assim como do subtipo 5-HT<sub>2A</sub> (JACOB et al., 2002; POPOVA, 2004; SCHENBERG et al., 2001). A injeção local de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> causa efeitos inibitórios sobre a fuga e estes efeitos são bloqueados pelo pré-tratamento local com cetanserina (antagonista de receptor 5-HT<sub>2A</sub>). Além disso, estudos recentes deste laboratório demonstraram que a injeção local de  $\alpha$ -metil-serotonina (agonista de receptor 5-HT<sub>2A</sub>) promove uma inibição da resposta de congelamento condicionado, implicando a participação deste subtipo de receptor na regulação do comportamento defensivo (CASTILHO et al., 2002). Baseado nestes resultados foi sugerido que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> atuariam de forma cooperativa na regulação das respostas de fuga eliciadas pela estimulação da SCPd, dando a idéia de uma interação funcional entre estes receptores na regulação do comportamento de fuga (JACOB et al., 2002; SCHENBERG et al., 2001).

Pesquisas sobre a natureza e mediação química dos substratos neurais da aversão na SCPd têm mostrado um grande número de dados apontando seu provável envolvimento com ataques de pânico (GRAEFF, 1990; BRANDÃO et al., 1999). Entre os neurotransmissores envolvidos nesta modulação, tem sido demonstrado que microinjeções de aminoácidos

excitatórios nas colunas dorsal e dorsolateral da SCP eliciam um padrão completo de comportamento defensivo em animais de laboratório (BANDLER et al. 1985; BANDLER; CARRIVE, 1988). Já outros estudos clínicos e pré-clínicos sugerem o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos no controle do transtorno de pânico e no modo de ação das drogas antipânico. Além disso, os resultados indicam que ambos os subtipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> inibem a aversão na SCPd, sugerindo a participação destes receptores no efeito terapêutico das drogas antipânico (JACOB et al., 2002; NOGUEIRA; GRAEFF, 1995).

As respostas incondicionadas induzidas pela estimulação do mesencéfalo são também acompanhadas por antinocicepção (FARDIN et al., 1984a, 1984b; BRANDÃO et al. 1994, 1999). Esta antinocicepção é mediada pela ação da serotonina nos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (COIMBRA et al., 1992; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; CASTILHO et al., 1999). No mesmo sentido, estudo desse laboratório aponta um papel similar dos mecanismos serotoninérgicos na antinocicepção condicionada a um estímulo neutro previamente associado com estimulação elétrica da SCPd, uma vez que, microinjeções de antagonistas serotoninérgicos nesta estrutura bloquearam esta resposta (CASTILHO; BRANDÃO, 2001).

***OBJETIVOS***



### **1. Geral**

O presente trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos da SCPd sobre o medo incondicionado de ratos expostos concomitantemente ao medo condicionado contextual.

### **2. Específicos**

- Avaliar os efeitos das drogas serotoninérgicas  $\alpha$ -metil-serotonina e cetanserina, agonista e antagonista seletivos de receptores do tipo 5-HT<sub>2A</sub>, respectivamente, sobre os limiares aversivos de congelamento e fuga determinados com o procedimento da estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos ingênuos e com experiência aversiva prévia. Para isto, os animais foram expostos ao condicionamento contextual aversivo com choques nas patas e submetidos à estimulação elétrica da SCPd nos limiares de congelamento e fuga no mesmo contexto ou em contexto diferente.
- Avaliar o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos no congelamento pós – estimulação aversiva da SCPd.

## **Experimento 1**

---

*Efeitos das drogas  $\alpha$ -metil-serotonina e cetanserina sobre os limiares aversivos de  
estimulação elétrica da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal*

---

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## **1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 250 – 280 g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo / Campus de Ribeirão Preto – SP. Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno medindo 33 x 17 x 40 (em média quatro animais por caixa), forradas com maravalha e com livre acesso a água e ração. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Psicobiologia da FFCLRP – SP, com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro de 12 x 12 h (início do ciclo claro às 7:00 h).

O trabalho faz parte de um projeto temático aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – protocolo n.º 06.1.123.8.53.9).

## **2. Cirurgia**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) via intraperitoneal (i.p.). Após a tricotomia, os animais foram fixados a um estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Em seguida foi feita a assepsia e administração subcutânea do anestésico local, Lidostesin (cloridrato de lidocaína 3%). O crânio do animal foi exposto e o periósteo removido. Com o auxílio de um perfurador ósseo, foi feito um orifício para a implantação de um quimitrodo unilateral feito com uma cânula-guia de aço inoxidável (d.e. 0,6 mm, d.i. 0,4 mm) conectada a um eletrodo bipolar na SCPd. O eletrodo bipolar foi feito de fio de aço inoxidável, com 160  $\mu\text{m}$  de diâmetro, totalmente isolado, exceto no corte transversal da ponta, a qual se estendia 1 mm abaixo da porção final da cânula-guia. Além disso, os fios do eletrodo eram conectados a um pino macho o que permitia a posterior conexão deste à porção terminal de um cabo elétrico flexível usado para a estimulação elétrica da SCPd. A barra do incisivo superior do estereotáxico foi fixada em 3,3 mm abaixo da linha interaural de modo que o crânio ficou horizontal entre bregma e lâmbda. O quimitrodo foi introduzido usando as

seguintes coordenadas, com lâmbda servindo como referência: antero-posterior = lâmbda, médio-lateral = + 1,4 mm, dorsoventral = - 5,1 mm (de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson, 2005), sempre com angulação de 16°. O quimitrodo foi fixado ao crânio por meio de uma resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável. Ao final da cirurgia, a cânula-guia foi fechada com um fio de aço inoxidável para evitar a obstrução da mesma.

Para evitar infecções após a cirurgia, foram administrados em cada animal 60.000 UI de solução antibiótica (Pentabiótico veterinário de pequeno porte – Fort Dodge), via intramuscular, e 0,02 ml / 0,3 ml de Banamine injetável pet (Schering - Plough), via subcutânea.

### ***3. Equipamentos***

#### ***3.1 Arena circular***

Para o procedimento de estimulação elétrica, os animais foram colocados em uma arena circular (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura) feita de acrílico transparente com o compartimento experimental iluminado por uma lâmpada fluorescente de 40W (80 lux no nível do piso). A arena ficava em cima de uma bancada ao lado de um estimulador de corrente contínua (Figura 1).

#### ***3.2 Estimulador de corrente contínua***

O aparelho utilizado para a estimulação elétrica foi um estimulador de corrente contínua de onda senoidal (ESF-12, DelVecchio, Brazil), ligado a um osciloscópio (Philips, USA), o qual permitia a monitoramento da intensidade de corrente elétrica a partir da medição da queda de tensão em um resistor de 1K $\Omega$  presente no interior do estimulador.



**Figura 1:** Fotografia da arena circular onde foi realizada a estimulação elétrica.

#### **4. Drogas**

Foram utilizados  $\alpha$ -metil-serotonina (maleato de alfa-metil-5-hidroxitriptamina – Sigma-Aldrich, EUA), agonista serotoninérgico específico de receptores 5-HT<sub>2A</sub> na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ l e cetanserina (tartarato de Cetanserina - Sigma-Aldrich, EUA), antagonista serotoninérgico específico de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> na dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ l. A solução salina (0,9%) foi usada como veículo para diluição das drogas e também como solução controle. As doses usadas nesse experimento foram baseadas em estudos prévios desse laboratório (CASTILHO; BRANDÃO, 2001; CASTILHO et al., 2002).

#### **5. Procedimento**

##### **5.1 Medida dos limiares aversivos induzidos pela estimulação elétrica da SCPd – Linha de Base**

Cinco dias após a cirurgia, os animais foram submetidos ao procedimento de estimulação elétrica para a determinação dos limiares aversivos de congelamento e fuga na linha de base, além do tempo de congelamento pós - estimulação.

O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente capaz de produzir a imobilidade do animal por um período maior ou igual a 6 segundos (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; MAISONNETTE et al., 1996), ou seja, total ausência de movimento do corpo e vibrissas, exceto pela respiração, acompanhado de pelo menos duas das seguintes respostas: dorso arqueado, piloereção, exoftalmia ou retração das orelhas, em duas séries consecutivas e ascendentes de estimulação elétrica (VIANNA et al., 2001a). A intensidade de corrente elétrica que produziu corridas (galopes) ou saltos em duas tentativas consecutivas foi considerada como limiar de fuga.

Para dar início à estimulação elétrica, o animal era colocado dentro da arena e seu eletrodo conectado a um cabo elétrico flexível, o qual permitia amplo movimento dentro da mesma. Este cabo, por sua vez, estava conectado ao estimulador de corrente contínua. Após 5 minutos de habituação, deu-se início ao procedimento de estimulação elétrica da SCPd. Todos os animais receberam intensidade de corrente elétrica inicial de 5  $\mu$ A (AC, 60 Hz) durante 15 s, a qual foi aumentando a passos crescentes de 5  $\mu$ A, com intervalos variáveis de 1 minuto, até a obtenção das respostas defensivas do animal. O valor numérico correspondente à intensidade de corrente elétrica necessária para desencadear a resposta comportamental desejada em cada animal, (congelamento e em seguida a fuga) foi registrado como limiar aversivo. Animais com limiar de fuga acima de 180  $\mu$ A foram descartados. Após a fuga, os animais foram observados durante oito minutos para registro do tempo de congelamento pós - estimulação. O tempo de congelamento pós – estimulação foi operacionalmente definido pela ausência total de movimentos do corpo e vibrissas, exceto pela respiração (VIANNA et al., 2001a, b).

## **5.2 Microinjeção**

Em seguida à determinação dos limiares aversivos da linha de base, cada animal foi gentilmente envolvido em uma toalha e uma fina agulha dental (d.e. 0,3 mm) foi introduzida através da cânula-guia 1 mm abaixo da sua porção final, alcançando assim a mesma profundidade da ponta do eletrodo. A agulha de injeção foi conectada a uma seringa Hamilton de 5  $\mu$ l por meio de um tubo de polietileno (PE – 10). Um volume total de 0,2  $\mu$ l de solução (salina,  $\alpha$ -metil-serotonina 20 nmol ou cetanserina 10 nmol) foi injetado em cada animal, durante 1 minuto, com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, Mass, USA). A agulha foi mantida no local por 1 minuto após a microinjeção, para evitar o refluxo da droga.

## **5.3 Teste - Ação das drogas sobre os limiares aversivos**

Dez minutos após a microinjeção das drogas, os animais foram recolocados na arena e submetidos à sessão teste, ou seja, novamente estimulados eletricamente para a redeterminação dos limiares aversivos (congelamento e fuga), bem como o tempo de congelamento pós-estimulação (mesmo procedimento descrito no item 5.1 acima).

## **6. Histologia**

Após conclusão dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com uma sobredose de uretana (25%; 0,5 ml /100g via i.p.) e submetidos à perfusão intracardíaca com solução salina (0,9%) seguida de formalina (4%). Os animais foram decapitados e em seguida, antes da retirada do quimitrodo, foi microinjetado através da cânula-guia solução de Azul de Evans (2%) no mesmo volume de droga injetada, a fim de marcar o sítio de microinjeção. Os encéfalos foram removidos e mantidos em solução de formalina por 3 horas, depois transferidos para solução de sacarose (30%) onde permaneceram até o dia da histologia.

Foram feitos cortes seriados do encéfalo (60  $\mu\text{m}$  de espessura) utilizando-se um criostato (Leica, Microsystems – Aotec – Instrumentos Científicos Ltda), montados em lâminas gelatinizadas, corados com a Coloração de Nissl para a localização exata do ponto onde estava inserida a porção final do eletrodo e o sítio de microinjeção das drogas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2005). Dados dos animais com a ponta do eletrodo localizada fora da SCPd não foram incluídos na análise estatística.

### 7. Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Os valores referentes ao congelamento pós – estimulação e os valores dos limiares aversivos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via. Os dados dos limiares aversivos apresentados neste trabalho correspondem à diferença entre o teste e a linha de base ( $\Delta$ ) em cada grupo (salina,  $\alpha$ -metil-serotonina 20 nmol e cetanserina 10 nmol). Diferenças significativas entre grupos foram avaliadas através do teste *post hoc* de Bonferroni. Um valor de *p* igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

### 8. Delineamento experimental

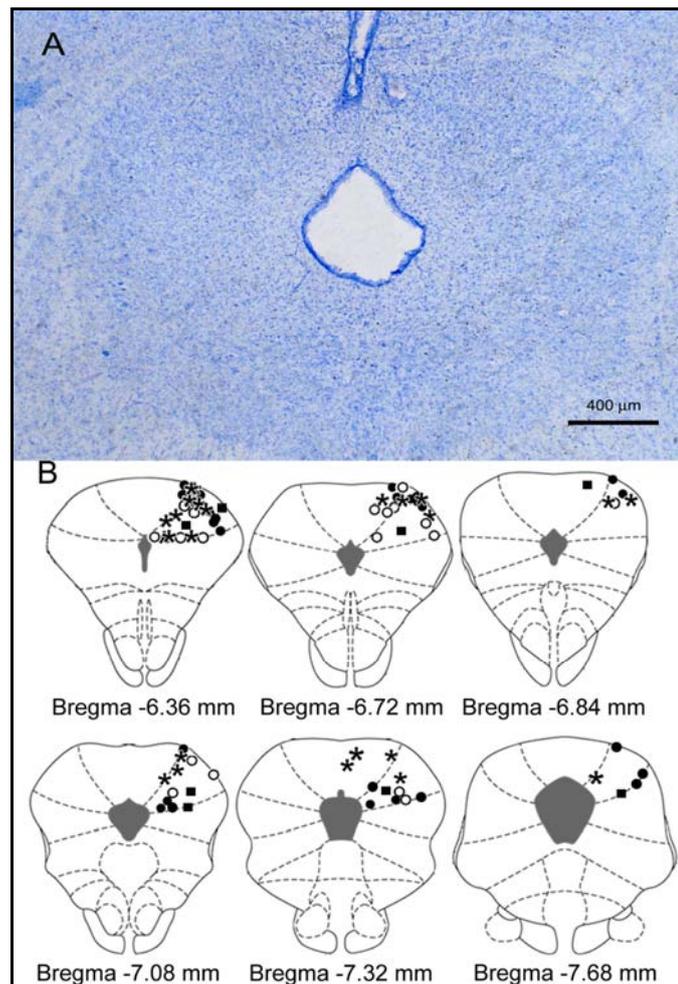
Tabela I: Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 1. Sal = salina;  $\alpha\text{ms 20}$  =  $\alpha$ -metil-serotonina dose 20 nmol/0,2  $\mu\text{L}$ ; Cet 10 = cetanserina dose 10 nmol/0,2  $\mu\text{L}$ ; Cong = congelamento; Fg = fuga; C.P.E. = congelamento pós – estimulação; seg = segundos.

Grupos	Linha de Base (LB)			Tratamento	Teste (T)		
	Limiares		C.P.E.		Limiares		C.P.E.
	Cong	Fg			Cong	Fg	
Sal	$\mu\text{A}$	$\mu\text{A}$	seg	Sal	$\mu\text{A}$	$\mu\text{A}$	seg
$\alpha\text{ms 20}$	$\mu\text{A}$	$\mu\text{A}$	seg	$\alpha\text{ms 20}$	$\mu\text{A}$	$\mu\text{A}$	seg
Cet 10	$\mu\text{A}$	$\mu\text{A}$	seg	Cet 10	$\mu\text{A}$	$\mu\text{A}$	seg

## ***RESULTADOS***

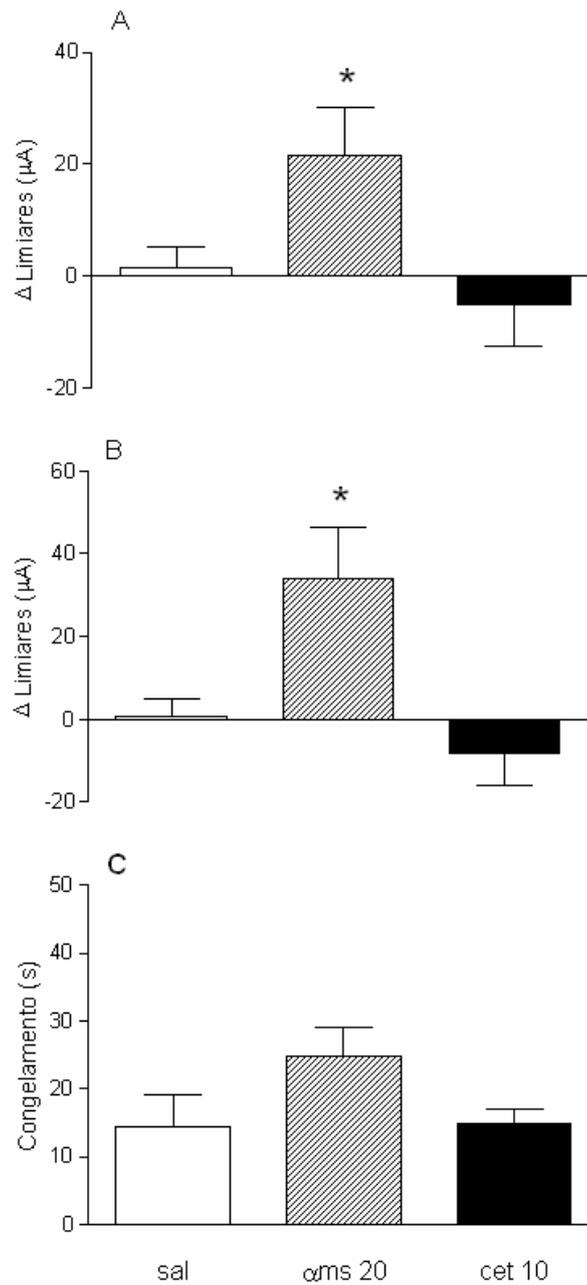


A Figura 2 ilustra os sítios de estimulação elétrica e microinjeção das drogas situados na SCPd dos animais submetidos aos experimentos 1 e 2, os quais foram identificados e assinalados em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005). Nem todos os sítios de microinjeção foram aqui representados devido a uma sobreposição dos pontos.



**Figura 2:** Fotomicrografia ilustrando a ponta do eletrodo (A) e os sítios de microinjeção das drogas (B) na SCPd. Animais salina (●),  $\alpha$ -metil-serotonina 20 nmol/0,2  $\mu$ L (\*), cetanserina 5 nmol/0,2  $\mu$ L (■) e cetanserina 10 nmol/0,2  $\mu$ L (○). Os números indicam a distância em milímetros de bregma. Barra com escala de 400  $\mu$ m.

A Figura 3 apresenta a média  $\pm$  E.P.M. dos limiares aversivos, bem como o tempo de congelamento pós-estimulação dos animais tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina (agonista seletivo de receptores 5-HT<sub>2A</sub>) ou cetanserina (antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>2A</sub>), 10 minutos antes da estimulação elétrica da SCPd. Os resultados referentes aos limiares de congelamento e fuga estão expressos na forma de diferença dos limiares entre o teste e a linha de base ( $\Delta$ ). A média dos limiares aversivos de congelamento e fuga dos animais tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina, na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ L ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina, na dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ L (cet 10) estão representados nas figuras 3A e 3B, respectivamente. A ANOVA de uma via revelou que o tratamento promoveu uma diferença significativa nos limiares de congelamento [ $F_{(2,19)} = 3,80$ ;  $p < 0,05$ ] e fuga [ $F_{(2,19)} = 5,27$ ;  $p < 0,05$ ]. A comparação *post-hoc* revelou que somente a droga  $\alpha$ -metil-serotonina foi capaz de promover efeito antiaversivo em ambas as reações defensivas. Com relação ao tempo de congelamento pós-estimulação, a análise estatística não revelou nenhum efeito dos tratamentos [ $F_{(2,19)} = 2,13$ ;  $p > 0,05$ ] (Fig. 3C).



**Figura 3:** Diferença entre as sessões teste e linha de base dos limiares de congelamento (A) e fuga (B) obtidos a partir da estimulação elétrica da SCPd de animais tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina (cet 10). Em C estão ilustrados os tempos de congelamento pós – estimulação da SCPd. N= 7, 9 e 6 para os grupos salina,  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20) e cetanserina (cet 10), respectivamente. Média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo salina.

## **Experimento 2**

---

*Mecanismos serotoninérgicos da SCPd no medo incondicionado em ratos submetidos ao condicionamento contextual aversivo*

---

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

### **1. Animais**

Conforme descrito no Experimento 1.

### **2. Cirurgia**

Conforme descrito no Experimento 1.

### **3. Equipamentos**

#### **3.1 Caixa de Condicionamento Contextual Aversivo**

O paradigma de condicionamento contextual aversivo usado neste experimento foi o pareamento de choque elétrico nas patas no ambiente da caixa experimental. Para isto, foi utilizada uma caixa de esquivas, denominada de Mesmo Contexto (MC), que consiste de uma caixa experimental com dimensões internas de 48 x 24 x 30 cm, feita com paredes de acrílico preto, exceto pelo teto e parede frontal, que são de acrílico transparente. Além disso, o teto apresenta no centro uma pequena abertura circular, que permite a passagem do cabo elétrico flexível, usado posteriormente para a estimulação elétrica. O piso da caixa é feito com 36 barras de aço inoxidável de 2 mm de diâmetro espaçadas por 1 cm umas das outras. Além disso, a caixa possui uma fonte de choque AC (Albarsh Instruments, Brasil) com regulador de intensidade, que permite a apresentação dos choques elétricos nas patas dos animais, sendo que os choques foram controlados por um microprocessador e uma placa I/O (Insight Equipamentos, Brasil) (Figura 4).

A caixa MC, também denominada de contexto A, está encerrada em uma câmara de atenuação acústica feita de compensado de madeira e revestida por Eucatex. Possui uma lâmpada vermelha de 15 W em seu interior, um sistema de ruído de fundo de 70 dB e uma janela de 15,5 x 15,5 cm na porta que permite a visualização dos animais.



**Figura 4:** Fotografia da caixa experimental usada no condicionamento contextual aversivo (mesmo contexto – MC)

### ***3.2 Arena Circular***

Uma arena circular como descrito no item 3.1 do Experimento 1 foi usada como Contexto Diferente (CD).

### ***3.3 Estimulador de Corrente Contínua***

Conforme descrito no Experimento 1.

## ***4. Drogas***

Conforme descrito no Experimento 1, porém, neste experimento, a cetanserina foi usada nas doses de 5 e 10 nmol/0,2  $\mu$ l, sendo que a dose de 5 nmol/0,2  $\mu$ l foi administrada somente nos animais do grupo testado no mesmo contexto.

## **5. Procedimento**

### **5.1 Medida dos limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd – Linha de Base**

Conforme descrito no Experimento 1, sendo que neste experimento, a medida dos limiares aversivos de todos os animais foi feita na caixa de condicionamento contextual aversivo (MC) e não na arena (CD).

### **5.2 Condicionamento Contextual Aversivo**

Logo após a determinação dos limiares aversivos, os animais foram submetidos ao condicionamento contextual aversivo. Para isto, o animal permaneceu na caixa MC, o cabo elétrico foi desconectado do quimitrodo e a fonte de choques nas patas foi ligada. Em seguida, através de um programa computacional conectado à fonte de choques (Esquiva - Insight Equipamentos, Brasil) foram apresentados 10 choques inescapáveis e não sinalizados nas patas, com intensidade de 0,6 mA, 1 s de duração com intervalo variando entre 15 e 45 s (média de 30 s). Ao final do condicionamento, os animais retornaram ao biotério.

### **5.3 Microinjeção**

Conforme descrito no Experimento 1.

Foi realizada 24 horas após o condicionamento contextual aversivo e 10 minutos antes da realização do teste.

### **5.4 Teste**

Nesta etapa, os animais foram divididos em dois grupos distintos:

**Mesmo Contexto** – Avaliação dos efeitos das drogas serotoninérgicas sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPd de animais testados no mesmo contexto onde receberam choques nas patas (caixa de esquiva – MC).

**Contexto Diferente** - Avaliação dos efeitos das drogas serotoninérgicas sobre o comportamento defensivo induzido pela estimulação elétrica da SCPd de animais testados em um contexto diferente daquele em que receberam choques nas patas (arena circular – CD).

Dez minutos após a microinjeção das drogas, cada animal foi colocado no mesmo contexto (caixa de esquiwa - MC) ou em contexto diferente (arena circular - CD) ao que foram submetidos ao condicionamento contextual aversivo. A sessão teste foi conduzida sem apresentação de choque nas patas. Durante os 3 minutos iniciais, os animais foram observados e o tempo de congelamento contextual apresentado por eles foi anotado para avaliação do medo contextual. Em seguida, os limiares aversivos (congelamento e fuga) foram novamente determinados para avaliação dos efeitos do condicionamento contextual aversivo sobre as respostas de medo incondicionado decorrentes da estimulação elétrica da SCPd, associados à drogas serotoninérgicas.

## **6. Histologia**

Conforme descrito no Experimento 1.

## **7. Análise Estatística**

Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Os valores do congelamento contextual, congelamento pós – estimulação e dos limiares aversivos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias, sendo um fator a condição (mesmo contexto x contexto diferente), e os tratamentos o outro fator (salina,  $\alpha$ -metil-serotonina 20 nmol, cetanserina 5 nmol e cetanserina 10 nmol). Assim como no experimento 1, os limiares aversivos apresentados neste experimento também correspondem à diferença entre o teste e a linha de base ( $\Delta$ ) em cada grupo (salina,  $\alpha$ -metil-serotonina 20, cetanserina 5 e cetanserina

10) em MC e CD. Diferenças significativas entre grupos foram avaliadas através do teste *post hoc* de Bonferroni. Um valor de  $p$  igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

### 8. Delineamento experimental

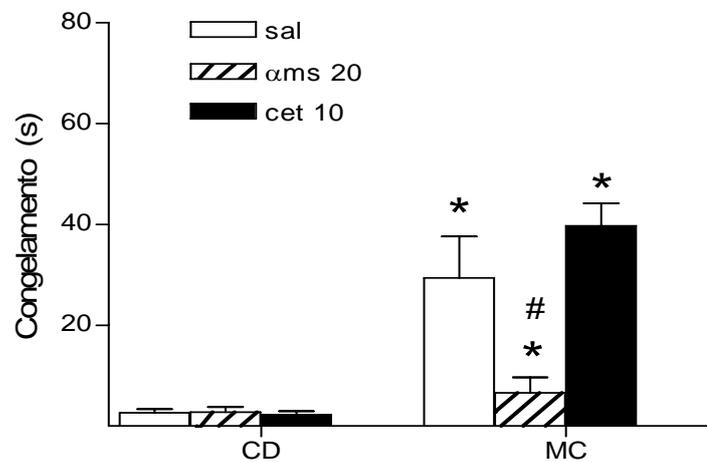
Tabela II: Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 2. Sal = salina;  $\alpha$ ms 20 =  $\alpha$ -metil-serotina dose 20 nmol/0,2  $\mu$ L; Cet 5/10 = cetanserina dose 5 ou 10 nmol/0,2  $\mu$ L; Cong = congelamento; Fg = fuga; CPE = congelamento pós – estimulação; seg = segundos; CCA = condicionamento contextual aversivo; MC = mesmo contexto; CD = contexto diferente; T = tempo; Tto = tratamento; TCC = tempo de congelamento contextual.

Grupos	Linha de Base (LB)			CCA	T	Tto	TCC (3min)	Teste (T)					
	Limiaries		CPE					MC			CD		
	Cong	Fg						Limiaries		CPE	Limiaries		CPE
			Cong					Fg	Cong		Fg		
Sal	$\mu$ A	$\mu$ A	seg	MC	24 h	Sal		$\mu$ A	$\mu$ A	seg	$\mu$ A	$\mu$ A	seg
$\alpha$ ms 20	$\mu$ A	$\mu$ A	seg	MC	24 h	$\alpha$ ms 20		$\mu$ A	$\mu$ A	seg	$\mu$ A	$\mu$ A	seg
Cet 5/10	$\mu$ A	$\mu$ A	seg	MC	24 h	Cet 5/10		$\mu$ A	$\mu$ A	seg	$\mu$ A	$\mu$ A	seg

## ***RESULTADOS***



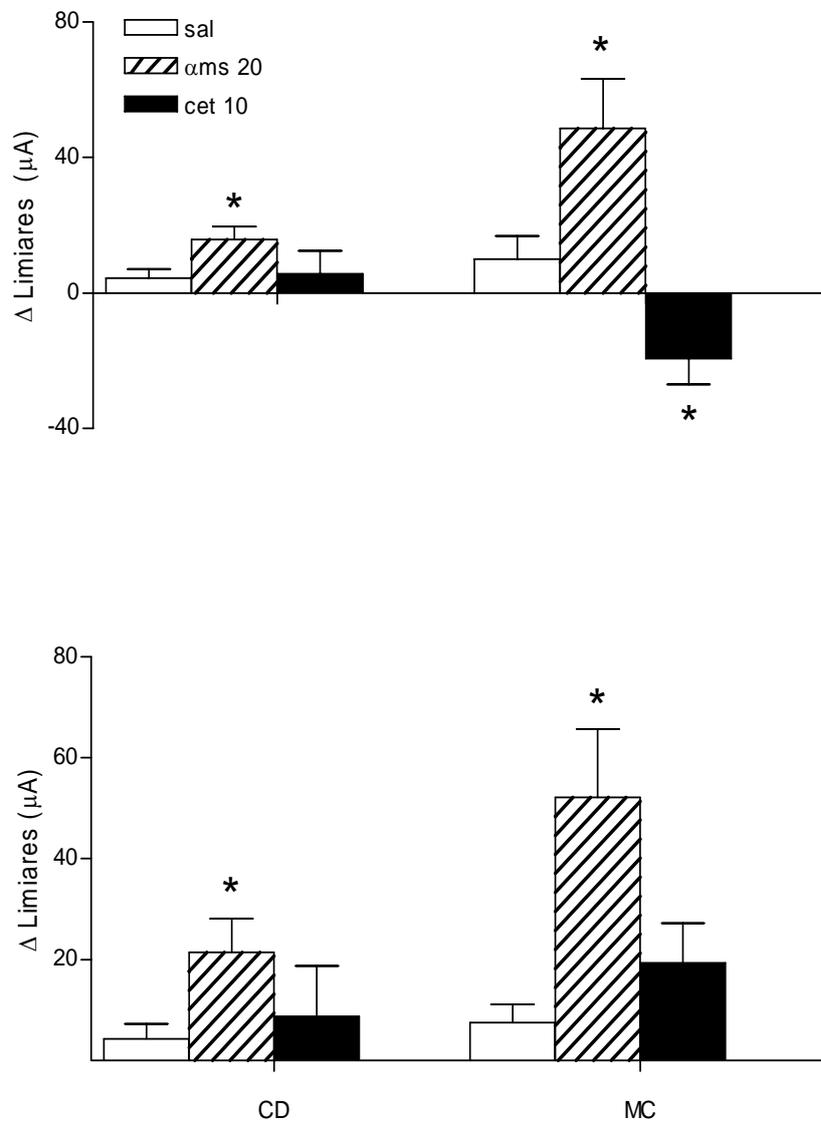
A Figura 5 refere-se ao paradigma do condicionamento contextual aversivo medido pelo tempo de congelamento apresentado pelos animais durante os 3 minutos iniciais da sessão teste. Um dia após o condicionamento contextual aversivo (com choques nas patas), os animais foram tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina, na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ L ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina na dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ L (cet 10). Em seguida, um grupo foi testado no mesmo contexto em que recebeu choques nas patas (mesmo contexto - MC) e outro grupo em um contexto diferente daquele em que foram condicionados (contexto diferente - CD). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do contexto sobre a resposta de congelamento [ $F_{(1,41)} = 46,98$ ;  $p < 0,05$ ]. Além disso, a análise estatística revelou um efeito dos tratamentos [ $F_{(2,41)} = 8,53$ ;  $p < 0,05$ ] e uma interação entre condição x tratamentos [ $F_{(2,41)} = 9,00$ ;  $p < 0,05$ ]. Estes resultados indicam que houve um aumento significativo no tempo de congelamento apresentado pelos animais testados no mesmo contexto, quando comparado com os animais testados no contexto diferente. Além disso, efeitos significativos do tratamento foram dependentes do contexto onde os choques foram apresentados. O teste *post-hoc* revelou uma redução significativa da expressão do medo condicionado contextual nos animais tratados com  $\alpha$ -metil-serotonina. Sendo assim, este resultado indica que o congelamento contextual aversivo usando choques nas patas foi susceptível à ação deste agonista 5-HT<sub>2A</sub>.



**Figura 5:** Média  $\pm$  E.P.M. do tempo de congelamento contextual (segundos) apresentado pelos animais que passaram pelo condicionamento aversivo e foram tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina (cet 10) e testados no mesmo contexto (MC) ou em contexto diferente (CD) daquele em que receberam choques nas patas. Grupo CD: N = 8 para todos os grupos. Grupo MC: N = 8 para salina,  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20) e N = 7 para cetanserina (cet 10). \* P < 0,05 em relação ao grupo correspondente testado no contexto diferente. # P < 0,05 em relação ao grupo salina testado no mesmo contexto.

A Figura 6 apresenta os efeitos das drogas serotoninérgicas sobre os limiares aversivos de congelamento e fuga determinados pela estimulação elétrica da SCPd em animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo e testados no mesmo contexto ou em contexto diferente ao do condicionamento. Na Figura 6A estão representadas as diferenças médias dos limiares de congelamento dos animais tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina, na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ L ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina na dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ L (cet 10) e testados no mesmo contexto (MC) ou em contexto diferente (CD). A ANOVA revelou um efeito significativo dos tratamentos sobre os limiares de congelamento [ $F_{(2,39)} = 12,15$ ;  $p < 0,05$ ], enquanto que o contexto não promoveu qualquer efeito [ $F_{(2,39)} = 0,48$ ;  $p > 0,05$ ]. Houve interação entre tratamento x contexto [ $F_{(2,39)} = 6,61$ ;  $p < 0,05$ ], mostrando que os efeitos dos tratamentos sobre os limiares de congelamento foram dependentes do contexto. O teste *post-hoc* mostrou um aumento significativo dos limiares nos animais submetidos ao condicionamento contextual e tratados com  $\alpha$ -metil-serotonina. Porém, nos animais tratados com cetanserina (cet 10), a análise estatística revelou uma redução significativa dos limiares de congelamento.

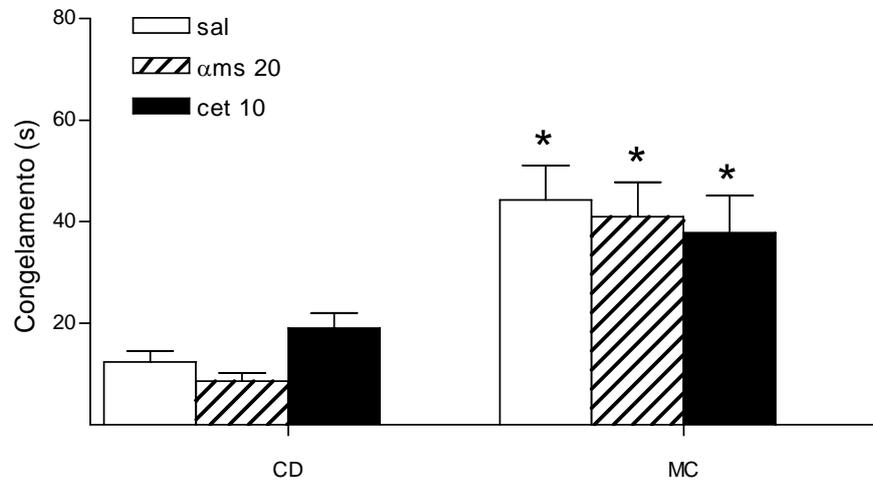
A Figura 6B mostra as diferenças médias dos limiares de fuga dos animais tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina, na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ L ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina na dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ L (cet 10) e testados no mesmo contexto (MC) ou em contexto diferente (CD). A ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento [ $F_{(2,39)} = 7,25$ ;  $p < 0,05$ ] e do contexto [ $F_{(1,39)} = 4,86$ ;  $p < 0,05$ ], porém, não houve interação entre contexto x tratamento [ $F_{(2,39)} = 1,43$ ;  $p > 0,05$ ]. A comparação *post-hoc* mostrou que somente a droga  $\alpha$ -metil-serotonina foi capaz de aumentar o limiar de fuga dos animais em ambos os contextos.



**Figura 6:** Diferença entre as sessões teste e linha de base dos limiares aversivos de congelamento (A) e fuga (B) determinados através da estimulação elétrica da SCPd de animais submetidos ao condicionamento contextual e tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina (cet 10) testados no mesmo contexto (MC) ou em contexto diferente (CD). Grupo CD: N = 7 para salina e  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20), N = 8 para cetanserina (cet 10). Grupo MC: N = 8 para salina e cetanserina (cet 10) e N = 7 para  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20). Média  $\pm$  E.P.M. \* P < 0,05 em relação ao grupo salina do grupo correspondente.

A Figura 7 ilustra o tempo de congelamento pós-estimulação elétrica da SCPd apresentado pelos animais após a obtenção do limiar de fuga. Os animais foram submetidos ao condicionamento contextual aversivo, tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina, na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ L ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina na dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ L (cet 10) e em seguida foram testados no mesmo contexto (MC) ou em contexto diferente (CD) daquele em que os choques foram apresentados. A ANOVA mostrou que não houve efeitos dos tratamentos [ $F_{(2,40)} = 0,31$ ;  $p > 0,05$ ] ou interação entre condição x tratamento [ $F_{(2,40)} = 1,13$ ;  $p > 0,05$ ]. Porém, foi observado um efeito significativo do fator condição, ou seja, do contexto [ $F_{(1,40)} = 42,22$ ;  $p < 0,05$ ], indicando que o comportamento de congelamento pós-estimulação foi altamente influenciado pelo contexto onde os animais receberam choques nas patas e os tratamentos não promoveram qualquer alteração no congelamento em ambas as condições observadas.

Os resultados obtidos com a cetanserina na dose de 5 nmol/0,2  $\mu$ l nos animais testados no mesmo contexto foram menos pronunciados, mas qualitativamente similares aos observados com a dose de 10 nmol/0,2  $\mu$ l.



**Figura 7:** Média  $\pm$  E.P.M. do tempo de congelamento pós-estimulação da SCPd (tempo em segundos) medido após a obtenção do limiar de fuga dos animais que foram submetidos ao condicionamento contextual e tratados com salina,  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20) ou cetanserina (cet 10) testados no mesmo contexto (MC) ou em contexto diferente (CD). Grupo CD: N = 8 para salina e cetanserina (cet 10) e N = 7 para  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20). Grupo MC: N = 8 para salina e cetanserina (cet 10) e N = 7 para  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ ms 20). \* P < 0,05 em relação ao grupo salina do grupo correspondente.

*DISCUSSÃO*



A estimulação da SCPd em sujeitos humanos pode produzir sensações desagradáveis de medo intenso (NASHOLD et al., 1969). Em ratos, a estimulação da SCPd promove uma rápida aquisição e manutenção de respostas operantes (por exemplo pressionar uma barra) que interrompe a estimulação e permite ao animal fugir da situação (BRANDÃO et al., 1982). No presente estudo, o aumento crescente de corrente elétrica aplicada à SCPd provocou um padrão completo de reação de defesa, com congelamento seguido da resposta de fuga.

Confirmando estudos anteriores, a microinjeção do agonista 5-HT<sub>2A</sub>  $\alpha$ -metil-serotonina aumentou, enquanto que a cetanserina, antagonista 5-HT<sub>2A</sub>, não promoveu qualquer alteração nos limiares aversivos determinados pela estimulação elétrica da SCPd (GRAEFF et al., 1986; NOGUEIRA; GRAEFF, 1995). Este resultado é contrário ao principal efeito aversivo causado pelas injeções de bloqueadores GABA-A na SCPd (BRANDÃO et al., 1982; GRAEFF et al., 1986; COIMBRA; BRANDÃO, 1997; CASTILHO et al. 2002; GRAEFF, 2004). Por esta razão, tem sido sugerido que os terminais gabaérgicos inibem tonicamente os neurônios envolvidos no comportamento defensivo, enquanto que os sistemas serotoninérgicos podem exercer uma inibição fásica nesta área (BRANDÃO et al., 1986, 2005; GRAEFF, 2004). Ou seja, enquanto mecanismos gabaérgicos exercem um controle persistente dos substratos neurais da aversão na SCPd, mecanismos serotoninérgicos o fazem somente em situações de perigo. De fato, no presente estudo a cetanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) foi efetiva em aumentar a aversividade da estimulação elétrica da SCPd somente nos animais colocados no mesmo contexto em que receberam choques nas patas.

O efeito mais proeminente das microinjeções de cetanserina na SCPd foi o efeito pró-aversivo na resposta de congelamento induzida pela estimulação elétrica da SCPd mas nenhum efeito foi observado no congelamento condicionado induzido pelas pistas contextuais previamente pareadas com choques nas patas. Diferentemente da cetanserina, o tratamento com  $\alpha$ -metil-serotonina causou o efeito antiaversivo esperado sobre a resposta de

congelamento induzida pela estimulação elétrica da SCPd de ratos submetidos ao procedimento de condicionamento. Estes resultados indicam que a regulação das respostas defensivas incondicionadas por mecanismos serotoninérgicos na SCPd dependem de experiências aversivas anteriores.

A interação entre as respostas de congelamento contextual e congelamento incondicionado evocado pela SCPd encontra um paralelismo com o que tem sido discutido em termos de consequências comportamentais e afetivas da interação entre dois diferentes tipos de estimulação aversiva. Estudos usando choques nas patas pareados com estímulos discretos (luz ou som) ou contextuais como estímulo condicionado têm demonstrado que a amplitude da resposta de sobressalto acústico é aumentada em condições de medo moderado e pode ser deprimida em situações de medo intenso (DAVIS; ASTRACHAN, 1978; WALKER et al., 1997; SANTOS et al., 2005). Outros estudos que avaliaram a influência da intensidade do estímulo aversivo nas respostas defensivas, mostraram que a associação de diferentes eventos estressores pode causar aumento do medo além de hiporreatividade (MAISONNETTE et al., 1993; MARITJENA et al., 1997). Neste estudo, a regulação 5-HT de comportamentos evocados pela estimulação da SCPd de ratos previamente condicionados difere daquela em ratos ingênuos na ausência de pistas contextuais. Assim, a influência do estímulo condicionado aversivo (pistas contextuais) sobre a resposta de congelamento evocada pela SCPd parece ser mediada por mecanismos 5-HT<sub>2A</sub> na SCPd.

Parece razoável assumir que os animais apresentam reação de defesa intensa a um estímulo incondicionado que ativa a SCPd em um ambiente que foi previamente pareado com choques. De fato, comportamentos defensivos são hierarquicamente organizados e diferentes comportamentos dentro desta classe são provocados por estímulos aversivos de diferentes intensidades (BLANCHARD et al., 1969, 1972). Por exemplo, o medo moderado pode ser

resultado de um estímulo ameaçador potencial ou distal, enquanto que o medo intenso poderia ser o resultado de um estímulo aversivo forte ou muito próximo (SANTOS et al., 2005).

A cetanserina promoveu uma diminuição no limiar de congelamento induzido pela estimulação elétrica da SCPd em ratos expostos a um estímulo condicionado de medo. Este efeito não pode ser interpretado como um efeito inespecífico da droga. Trata-se de uma adição de efeitos aversivos. De fato, ratos submetidos à apresentação de diversos estímulos aversivos apresentam um incremento na resposta de congelamento, como indicado pela intensa resposta de congelamento de ratos sob o medo condicionado contextual e estimulação pós-fuga da SCPd. Assim, o congelamento pós-estimulação da SCPd é muito maior em animais condicionados do que em animais não condicionados. Consequentemente, esta associação poderia tornar os animais mais capazes de receber todo tipo de informação sensorial, o que os tornaria menos capazes de exibir comportamento de fuga em resposta à estimulação elétrica da SCPd no limiar de fuga. Esta possibilidade estabelece um paralelo entre a função não monotônica da reação de medo de acordo com as condições de perigo (DAVIS; ASTRACHAN, 1978; WALKER et al., 1997; SANTOS et al., 2005, 2006). Consistente com esta hipótese, um recente estudo deste laboratório demonstrou que a estimulação aversiva do teto mesencefálico causou uma redução significativa na resposta do sobressalto dos ratos em função do congelamento intenso que apresentavam e que os impedia de expressar o sobressalto (NOBRE et al., 2003). Entretanto, no presente estudo, pelo menos quanto ao desempenho motor o congelamento contextual não prejudicou a resposta de fuga nos animais que recebiam estimulação elétrica da SCPd (no limiar de fuga) no mesmo contexto onde receberam choques nas patas 24 h antes. Isto se deve ao fato de que o congelamento contextual neste estudo pode ser considerado moderado e durava menos que os três minutos entre o momento em que eram colocados na caixa experimental (MC) e o início da determinação dos limiares aversivos por estimulação da SCPd.

Outra possibilidade é que os mecanismos mediados por serotonina da SCPd inibem indiretamente os substratos neurais do medo condicionado em outras regiões, tais como a substância cinzenta periaquedutal ventral. Neste contexto, estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a maioria dos receptores serotoninérgicos da SCPd são do tipo 5-HT<sub>2</sub> e que a serotonina regula estados aversivos nesta região através da ativação da transmissão inibitória gabaérgica (BRANDÃO et al., 1991; LOVICK, 1993). O aumento desta inibição pela  $\alpha$ -metil-serotonina poderia gerar grande atividade das eferências gabaérgicas da SCPd para a SCPv tendo como resultado uma inibição do medo condicionado. Como suporte a esta hipótese, tem sido demonstrado que lesões da SCPd aumenta o congelamento condicionado organizado na SCPV (DE OCA et al., 1998).

Tem sido também proposto que mecanismos 5-HT<sub>2A</sub> ativam interneurônios GABA em estruturas do sistema encefálico aversivo (BRANDÃO et al., 1991; STUTZMANN; LEDOUX, 1999; GRAEFF, 2004). Assim, o bloqueio de receptores 5-HT<sub>2A</sub> tende a reduzir a atividade gabaérgica e a facilitar a aversão. De fato, microinjeções de cetanserina no núcleo basolateral da amígdala (BLA) aumentou o medo incondicionado eliciado pela estimulação do teto mesencefálico (MACEDO et al., 2006). Mais ainda, o efeito ansiolítico causado por  $\alpha$ -metil-serotonina microinjetado no BLA na imobilidade tônica de cobaias foi revertido com o pré-tratamento com cetanserina (LEITE-PANISSI et al., 2006).

É razoável assumir que o congelamento pós-estimulação da SCPd é uma resposta condicionada ao contexto onde a estimulação elétrica da SCPd foi previamente apresentada. Em estudos prévios deste laboratório usando o procedimento do condicionamento contextual aversivo, foi demonstrado que este congelamento persiste mesmo quando o animal é colocado em um contexto diferente logo após a estimulação da SCPd (VIANNA et al., 2001 a,b). No presente estudo, o congelamento pós-estimulação dos animais injetados com salina foi potencializado no contexto onde foi feito o condicionamento com choque nas patas. Estes

achados indicam que o congelamento pós-estimulação da SCPd, em animais condicionados ou não, persiste em novo contexto (contexto neutro).

O congelamento pós-estimulação parece estar sob diferente regulação daquela do medo evocado pela SCPd, uma vez que lesões eletrolíticas ou inativação com muscimol do complexo amigdalóide reduziu o congelamento pós-estimulação da SCPd, mas não alterou as respostas de congelamento e fuga evocadas pela SCPd (OLIVEIRA et al., 2004; RUIZ-MARTINEZ et al., 2006). O congelamento pós-estimulação da SCPd parece estar envolvido com informações aversivas ascendentes, que são provavelmente transmitidas à amígdala. Assim, eferências ascendentes da SCPd parecem ser ativadas durante esta condição e a ausência de alteração nos limiares de congelamento e fuga observada em animais amígdala-lesionados pode estar ligada ao fato de que a SCPd contém substratos neurais para a produção do medo incondicionado. Sendo assim, a estimulação de uma estrutura próxima à saída motora, como é o caso da SCPd, cancela a influência vinda de estruturas situadas acima do ponto de estimulação, como a amígdala.

A participação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> da SCPd parece não estar envolvida na modulação do congelamento pós-estimulação, uma vez que nenhum efeito foi obtido após injeções de  $\alpha$ -metil-serotonina e cetanserina na SCPd nesta variável. Por outro lado, outros trabalhos têm mostrado que agonistas 5-HT<sub>2A</sub> aumentam a regulação das estruturas neurais responsáveis pela produção do medo na SCPd (NOGUEIRA et al., 1995; CASTILHO et al., 2001, 2002). Assim, embora o congelamento evocado pela estimulação direta da SCPd e o congelamento pós-estimulação da SCPd possam estar interrelacionados, eles parecem ter diferentes substratos neurais da mesma forma que o congelamento e a fuga evocados pela estimulação da SCPd podem ter mecanismos neurais dissociados (FERREIRA-NETTO et al., 2005; BORELLI et al., 2005).

Em resumo, os resultados aqui apresentados são indicativos de que reações defensivas como as respostas de congelamento e fuga geradas pela simples estimulação da SCPd de animais ingênuos são comutadas a um padrão distinto de resposta defensiva quando os ratos são colocados em um contexto onde eles tiveram uma experiência aversiva anterior. Atualmente, existe grande concordância de que estímulos aversivos proximais, tais como a presença de um predador, estimula a SCPd. A estimulação elétrica desta estrutura mimetiza um estímulo incondicionado de medo natural e a reação de medo incondicionado resultante tem sido considerada como um modelo de ataque de pânico (GRAEFF, 2004). A sensibilidade aumentada da SCPd a estímulos aversivos em animais sob medo condicionado contextual pode estar subjacente a condições como o distúrbio do pânico com agorafobia (CASTILHO et al., 2001).

O congelamento incondicionado eliciado pela estimulação elétrica da SCPd de ratos submetidos ao condicionamento contextual aversivo foi aumentado pela cetanserina, porém foi inibido pela  $\alpha$ -metil-serotonina quando microinjetado na SCPd. Sabendo que a administração de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRI's) é efetiva em melhorar muitos dos sintomas de distúrbios mentais, tais como, ansiedade antecipatória e distúrbio do pânico, o presente estudo reforça ainda mais a necessidade de melhor conhecermos a regulação 5-HT da ansiedade. A busca por compostos com ação seletiva sobre os receptores de serotonina que possam mediar ações terapêuticas de agonistas 5-HT no estresse que antecipa as psicopatologias associadas com a ativação da SCPd pode ser um caminho a seguir. Suporte a isto, são as evidências de que a administração crônica de antidepressivos atenua os comportamentos defensivos evocados pela estimulação da SCPd (BORELLI et al., 2004). De acordo com o exposto no presente estudo, seria interessante pensar que o aumento da função 5-HT<sub>2A</sub> na SCPd seria útil nestas condições.

*CONCLUSÕES*



Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que:

- Mecanismos serotoninérgicos estão envolvidos na expressão de comportamentos defensivos evocados pela estimulação elétrica da SCPd, uma vez que a administração local do agonista  $\alpha$ -metil-serotonina, na dose de 20 nmol/0,2  $\mu$ L promoveu efeito antiaversivo nos animais sem experiência aversiva prévia.
- Nos animais que foram submetidos ao condicionamento de medo contextual, a SCPd parece tornar-se mais sensível aos estímulos aversivos de sua estimulação elétrica e, particularmente a resposta de congelamento é potencializada pelo bloqueio de receptores 5-HT<sub>2A</sub> da SCPd pela cetanserina.
- A experiência aversiva prévia pode produzir alterações na função sináptica dos receptores do tipo 5-HT<sub>2A</sub> da SCPd o que pode ter provocado alterações na expressão dos comportamentos defensivos estudados neste trabalho.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- ANTONIADIS, E.A.; MCDONALD, R.J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 101(1), p. 1-13, 1999.
- AVANZI, V.; CASTILHO, V.M.; ANDRADE, T.G.C.S.; BRANDÃO, M.L. Regulation of contextual by the median raphe nucleus. **Brain Research**, v. 790(1-2), p. 178-184, 1998.
- BANDLER, R.; DE PAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. **Behavior Brain Research**, v. 15, p. 107-109, 1985.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. **Brain Research**, v. 439, p. 95-106, 1988.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. **Plenum Press**, New York, p. 1-8, 1991.
- BERTON, F.; VOGEL, E.; BELZUNG, C. Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. **Physiology & Behavior**, v. 65(2), p. 247-254, 1998.
- BLANCHARD, D.C. & BLANCHARD, R.J. Crouching as an index of fear. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 67, p. 370-375, 1969.
- BLANCHARD, D.C. & BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, p. 281-290, 1972.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 103(1), p. 70-82, 1989.

- BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 557-566, 2004.
- BORELLI, K.G.; FERREIRA-NETTO, C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABA<sub>A</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 105, p. 100-111, 2005.
- BRANDÃO, M.L.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 16, p. 397-402, 1982.
- BRANDÃO, M.L.; DISCALA, G.; BOUCHET, M.K.; SCHMITT, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 497-502, 1986.
- BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C.; LEÃO-BORGES, P. C. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 14, p. 495-499, 1990.
- BRANDÃO, M.L.; LOPEZ-GARCIA, J.A.; ROBERTS, M.H.T. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT<sub>2</sub> and depressant 5-HT<sub>1A</sub> receptors on neurones of the rat midbrain tectum. **Brain Research**, v. 556, p. 259-266, 1991.
- BRANDÃO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELLO, L. L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N. C. The neural of substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 18, p. 339-46, 1994.

- BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDÓSSIO, J. E.; DE ARAÚJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 2, p. 863-75, 1999.
- BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; SILVA, M.A.S.; HUSTON, J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 225-233, 2003.
- BRANDÃO, M.L.; BORELLI, K.G.; NOBRE, M.J.; SANTOS, J.M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; MARTINEZ, R.C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1299-1311, 2005.
- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neural organization. **Behavioural Brain Research**, v. 58 (1-2), p. 27-47, 1993.
- CARRIVE, P.; LEE, J.; SU, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 95(4), p. 1071-1080, 2000.
- CARRIVE, P. Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and  $\alpha$ -adrenergic blockade. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 98(1-2), p. 90-93, 2002.
- CASTILHO, V. M.; AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, p. 425-431, 1999.
- CASTILHO, V.M. & BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as

- unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 154-162, 2001.
- CASTILHO, V.M.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacology**, v. 165, p. 77-85, 2002.
- CATTARELLI, M.; CHANEL, J. Influence of some biologically meaningful odorants on vigilance states of the rat. **Physiology & Behavior**, v. 23(5), p. 831-848, 1979.
- COIMBRA, N. C.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M. L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behavior Brain Research**, v. 50, p. 77-83, 1992.
- COIMBRA, N.C. & BRANDÃO, M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 59, p. 131-139, 1993.
- COIMBRA, N.C. & BRANDÃO, M.L. Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, v. 87, p. 97-103, 1997.
- DAVIS, M. & ASTRACHAN, D.I. Conditioned fear and startle magnitude: Effects of different footshock and backshock intensities used in training. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 4, p. 95-103, 1978.
- DAVIS, M.; WALKER, D. L.; LEE, Y. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 821, p. 305-331, 1997.

- DE OCA, B.N.; DECOLA, J.P.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 3426-3432, 1998.
- FANSELOW, M.S.; BOLLES, R.C. Triggering of endorphin analgesia reaction by a cue previously associated with shock. Reversal by naloxone. **Bulletin of Psychology Society**, v. 14, p. 88-90, 1979.
- FANSELOW, M.S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlovian Journal of Biological Science**, v. 15(4), p. 177-182, 1980.
- FANSELOW, M.S.; BAACKES, M.P. Conditioned fear-induced opiate analgesia on the formalin test: evidence for two aversive motivational systems. **Learning and Motivation**, v. 13(2), p. 200-221, 1982.
- FANSELOW, M.S. What is conditioned fear? **Trends in Neuroscience**, v. 7, p. 460-462, 1984.
- FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J.L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioural side effects together with analgesia. **Brain Research**, v. 306, p. 105-123, 1984a.
- FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J.L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. II. Differential characteristics of the analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. **Brain Research**, v. 306, p. 125-139, 1984b.
- FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience Behavior Reviews**, v. 23(5), p. 743-760, 1999.
- FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by

- injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Research**, v. 1031, p. 151-163, 2005.
- GEWIRTZ, C.J.; DAVIS, M. Using pavlovian Higher-Order conditioning paradigm to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learning & Memory**, v. 7, p. 257-266, 2000.
- GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; AUDI, E.A.; SCHULTZ, M.T.B. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behavior Brain Research**, v. 21, p. 65-72, 1986.
- GRAEFF, F.G. **Brain defense systems and anxiety**. In: Handbook of anxiety, vol. 3. Roth, M.; Burrow, G.D.; Noyers, Jr., (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 307-354, 1990.
- GRAEFF, F. G. & BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. 4ª Edição. São Paulo: *Editora Lemos*, 188 p., 1999.
- GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467-476, 2002.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 239-259, 2004.
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N., eds. 2<sup>nd</sup> ed. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system**. Oxford: *Oxford University Press*, p. 204-32, 2000.
- JACOB, C. A.; CABRAL, A. H.; ALMEIDA, L. P. et al. Chronic imipramine enhances 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal

- periaqueductal gray. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 761-766, 2002.
- JENCK, F.; MOREAU, J.L; MARTIN, J.R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: Elements of face and predictive validity. **Psychiatry Research**, v. 57, p. 181-191, 1995.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian conditioning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29(2), p. 149-173, 1996.
- LEÃO-BORGES, P. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 1027-1031, 1988.
- LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 8(7), p. 2517-2519, 1988.
- LEITE-PANISSI, C.R.; FERRARESE, A.A.; TERZIAN, A.L.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. **Brain Research Bulletin**, v. 69, p. 356-364, 2006.
- LEMAN, S.; DIELENBERG, R.A; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 143, p. 169-176, 2003.
- LOVICK, T.A. Serotonergic influence from raphe nucleus obscurus on neurons in the periaqueductal gray matter in the rat. **Brain Research**, v. 606, p. 92-98, 1993.
- MACEDO, C.E.; MARTINEZ, R.C.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the inferior colliculus are differentially sensitive to injections of muscimol

- into the basolateral nucleus of the amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v. 120(3), p. 625-631, 2006.
- MAGIEREK, V.; RAMOS, P.L.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; NOGUEIRA, R.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray. **NeuroReport**, v. 14, p. 1641-1644, 2003.
- MAISONNETTE, S.S.; MORATO, S.; BRANDÃO, M.L. Role of resocialization and of 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus maze test. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 753-758, 1993.
- MAISONNETTE, S.S.; KAWASAKI, M.C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research Bulletin**, v. 40, p. 93-98, 1996.
- MARITJENA, I.D.; CALVO, N.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V.A. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. **Brain Research**, v. 752, p. 136-142, 1997.
- NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 14-24, 1969.
- NOBRE, M.J.; SANDNER, G.; BRANDÃO, M.L. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Hearing Research**, v. 184, p. 82-90, 2003.
- NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of aversion generated in the dorsal periaqueductal gray. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 1-6, 1995.

- OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. **NeuroReport**, v. 15, p. 2281-2285, 2004.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, CA: Academic Press, 2005.
- PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contributions of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, p. 274-85, 1992.
- POPOVA, N. K. The role of brain serotonin in the expression of genetically determined defensive behavior. **Genetika**, v. 40 (6), p. 770-778, 2004.
- RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, p. 58-65, 2006.
- SAKAGUCHI, A.; LEDOUX, J.E.; REIS, D.J. Sympathetic nerves and adrenal medulla contributions to cardiovascular conditioned emotional responses in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 5(7), p. 728-738, 1983.
- SANTOS, J.M.; GÁRGARO, A.C.; OLIVEIRA, A.R.; MASSON, S.; BRANDÃO, M.L. Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. **European Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, p. 239-246, 2005.
- SANTOS, J.M.; MARTINEZ, R.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of acute and subchronic treatments with fluoxetine and desipramine on the memory of fear in moderate and high-intensity contextual conditioning. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, p. 121-128, 2006.

- SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRE, E.C.M.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 647-659, 2001.
- SCHMITT, P.; DI SCALA, G.; BRANDÃO, M.L.; KARLI, P. Periventricular structures, elaboration of aversive effects and processing of sensory information. In: BLANDER, R., (Ed). **Modulation of Sensorimotor Activity during Alterations in Behavioral States**. Alan R. Liss, New York, pp. 393-414, 1984.
- SILVA, R.C.B.; GÁRGARO, A.C.; BRANDÃO, M.L. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. **Behavior Brain Research**, v. 151, p. 93-101, 2004.
- STUTZMANN, G.E.; LEDOUX, J.E. GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 19(11), RC8, 1999.
- VIANNA, D.M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal. periaqueductal gray. **Learning and Memory**, v. 8, p. 164-169, 2001a.
- VIANNA, D.M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, v. 25, p. 711-719, 2001b.
- WALKER, D.L.; CASSELLA, J.V.; LEE, Y.; DE LIMA, T.C.M.; DAVIS, M. Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, v. 21, p. 743-753, 1997.
- WALLACE, K.J.; ROSEN, J.B. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear of a predator odor: Comparison with electrolytic lesions. **The Journal of Neuroscience**, v. 21(10), p. 3619-3627, 2001.

\* De acordo com:

Manual de Referências e Citações Bibliográficas do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP,  
baseado nas normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).