

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

BÁRBARA MORAES COSTA

O papel dos receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade

Ribeirão Preto

2023

BÁRBARA MORAES COSTA

O papel dos receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Ribeirão Preto

2023

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

Costa, Bárbara Moraes

O papel dos receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade. Ribeirão Preto, 2023.

38 p.: il.

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

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Hipocampo Ventral. 2. Serotonina. 3. Ansiedade. 4. Receptores 5-HT_{2C}. 5. Teste de Vogel.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: COSTA, Bárbara Moraes

Título: O papel dos receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____

Prof. _____

Instituição: _____

Prof. _____

Instituição: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos que estiveram presente em minha jornada até aqui, familiares e amigos. Em especial à minha querida avó Iris, a qual é uma grande mulher.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar minha gratidão a todas as pessoas que tornaram possível este trabalho. Sem o apoio, orientação e incentivo de pessoas tão importantes em minha jornada, isso não seria possível.

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior pela oportunidade, por sua orientação, sugestões e *feedbacks* que foram fundamentais para desenvolver esta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, agradeço por dedicarem seu tempo e conhecimento para avaliar este trabalho, contribuindo com enriquecedoras sugestões e discussões para aprimorá-lo.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório e amigos: Paloma, Jefferson, Alana, Matheus, Heloísa, Cristian e Jhonatan, por compartilharem suas ideias e apoio ao longo deste percurso. Também sou grata ao nosso querido técnico Afonso.

Aqui registro um agradecimento especial à Paloma, pela qual eu tenho uma enorme gratidão e um enorme carinho, pois foi quem me auxiliou e me ajudou dividindo todo o seu conhecimento e a sua experiência ao longo desse trabalho. Além de ter se tornado uma amiga.

À minha avó Iris, à minha mãe Marcilene, ao meu padrasto Abrahão, por me apoiarem e me ajudarem nessa jornada. Ao meu irmão, tios, primos e amigos que também estiveram aqui quando precisei. Muito obrigada, vocês também fazem parte dessa conquista.

Também expresso minha gratidão aos demais professores do Departamento de Farmacologia e também aos meus professores da Universidade Católica de Brasília, que de alguma forma contribuíram para este trabalho e também para a minha formação acadêmica.

À Universidade de São Paulo e ao seu corpo de funcionários, por proporcionarem durante essa caminhada toda a estrutura necessária. Em especial aos funcionários da SPG, da FMRP e do Departamento de Farmacologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio.

Agradeço aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou, e foram minha rede de apoio por muitas vezes. Rose e Renato, não só por terem me abrigado em Ribeirão pela primeira vez, mas também por terem se tornado tão especiais. Vitor, por dividir experiências e a casa comigo. Ao Matheus que se fez presente em boa parte dessa jornada e me ensinou muitas coisas sobre a vida. À Gabriela por ser uma amiga tão engraçada e que me faz sorrir. Ao Geovani e à Bruna que se tornaram muito especiais. E ao Renan que foi tão significativo.

Agradeço também aos amigos de longa data, Isabella, Amanda, Lorena, Gabriel, Ronaldo, Dani, Eduarda e Willian. Obrigada por se fazerem presentes mesmo tão distantes, sei que posso contar com vocês.

Expresso também minha gratidão a Deus e ao meu psiquiatra, Otávio.

Por fim, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que seus nomes não estejam aqui mencionados. Cada interação e troca de conhecimentos moldaram essa jornada.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

COSTA, Bárbara Moraes. **O papel dos receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) tem como principal característica a preocupação persistente e excessiva, que ocorre na maioria dos dias, sendo acompanhada de pelo menos três sintomas, que podem ser físicos ou emocionais, como irritabilidade, perda de sono e tensão muscular. Evidências na literatura apontam o hipocampo ventral (HV) como uma estrutura importante na elaboração e controle de respostas defensivas frente a situações de conflito, do tipo aproximação-esquiva, que são associados à ansiedade. O sistema serotoninérgico é um dos sistemas de neurotransmissão que estão envolvidos nessas respostas. Dentre os diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos existentes, os do tipo 5-HT_{2C} têm sido frequentemente associados à ansiedade. Estudos, ainda que escassos, utilizando o labirinto em cruz elevado (LCE), indicam que a estimulação destes receptores no HV causa efeito ansiogênico. Porém, os efeitos do tratamento crônico com antidepressivos, principais drogas utilizadas no tratamento do TAG, nesses receptores ainda não foram elucidados. Diante do exposto, a fim de se investigar a generalidade dos efeitos obtidos previamente no modelo do LCE, inicialmente avaliamos as consequências de injeções intra-HV de drogas que interagem com os receptores 5-HT_{2C} em ratos Sprague-Dawley submetidos ao teste do beber punido de Vogel. Para tal, foram usadas as drogas MK-212 e SB-242084, respectivamente, agonista e antagonistas desse sítio de ligação. Na segunda etapa do trabalho, investigamos os efeitos ocasionados pelo tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina sobre a reatividade desses receptores. Os resultados obtidos mostraram que enquanto a administração intra-HV de MK-212 tem efeito ansiogênico, a de SB-242084 foi destituída de efeito. Por fim, os dados preliminares obtidos indicam que o tratamento crônico com a fluoxetina diminui o efeito ansiogênico causado pela administração de MK-212 no HV.

Palavras-chave: Hipocampo Ventral. Serotonina. Ansiedade. Receptores 5-HT_{2C}. Teste de Vogel.

ABSTRACT

COSTA, Bárbara Moraes. **The role of ventral hippocampus 5-HT_{2C} receptors in mediating defensive behaviors associated with anxiety.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Generalized anxiety disorder (GAD) is characterized by persistent and excessive worry, which occurs on most days, accompanied by at least three symptoms, which may be physical or emotional, such as irritability, sleep disturbance and muscle tension. Evidence in the literature points to the ventral hippocampus (VH) as an important structure in the mediation of defensive responses to conflict situations, of the approach-avoidance type, which are associated with anxiety. The serotonergic system is one of the neurotransmission systems that are involved in these responses. Among the different existing serotonergic receptor subtypes, 5-HT_{2C} receptors have been frequently associated with this emotion. Studies, although scarce, using the elevated plus maze (EPM), indicate that the stimulation of these receptors in the HV causes an anxiogenic effect. However, the effects of chronic treatment with antidepressants, the main drugs used in the treatment of GAD, in these receptors have not yet been elucidated. Given the above, to investigate the generality of the effects obtained previously in the EPM model, we initially evaluated the consequences of intra-HV injections of drugs that interact with 5-HT_{2C} receptors in rats Sprague-Dawley submitted to the punished drinking test of Vogel. For this, the drugs MK-212 and SB-242084 were used, respectively, agonist and antagonist of this binding site. Next, we investigated the effects caused by the chronic treatment (21 days) with fluoxetine on the reactivity of these receptors. The results obtained showed that while intra-HV administration of MK-212 has an anxiogenic effect, SB-242084 had no effect. Finally, the preliminary data obtained indicate that chronic treatment with fluoxetine decreases the anxiogenic effect caused by the administration of MK-212 in HV.

Keywords: Ventral Hippocampus. Serotonin. Anxiety. 5-HT_{2C} receptors. Vogel test

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA.....	10
1.2 COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E A ANSIEDADE.....	11
1.3 SUBSTRATOS NEURAIS RELACIONADOS À ANSIEDADE.....	12
1.4 HIPOCAMPO, SEROTONINA E ANSIEDADE	13
2 OBJETIVOS	18
2.1 GERAL	18
2.2 ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAIS E METÓDOS	19
3.1 ANIMAIS	19
3.2 DROGAS.....	19
3.3 APARATOS.....	19
3.3.1 Teste do beber punido de Vogel	19
3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	20
3.5 PROCEDIMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
3.5.1 Teste do beber punido de Vogel	21
3.5.1.1 <i>Experimento 1: Efeitos da manipulação farmacológica de receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral em ratos submetidos ao teste de Vogel</i>	21
3.5.1.2 <i>Experimento 2: Tratamento crônico com a fluoxetina sobre o efeito causado pela injeção intra-HV do MK-212 ao teste de Vogel</i>	21
3.5.2 Análise Histológica	22
3.5.3 Análise de Dados	22
4 RESULTADOS	23
4.1 EXPERIMENTO 1A: CURVA DOSE-RESPOSTA MK-212.....	23
4.2 EXPERIMENTO 1B: CURVA DOSE-RESPOSTA SB-242084.....	24
4.3 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM FLUOXETINA SOBRE O EFEITO CAUSADO PELA INJEÇÃO INTRA-HV DE MK-212 NO TESTE DO BEBER PUNIDO DE VOGEL	25
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA

A ansiedade pode ser descrita como um estado emocional subjetivo caracterizado por alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas, frente a situações aversivas indeterminadas ou imprecisas. Em termos evolutivos, sabe-se que a ansiedade é imprescindível para sobrevivência, uma vez que funciona como um “alarme”, permitindo que o organismo possa se preparar para responder de maneira adequada ao estímulo estressor (Bateson *et al.*, 2011). Por outro lado, quando manifestada de maneira exacerbada e persistente, tende a tornar-se patológica, acarretando prejuízo significativo do funcionamento regular do indivíduo (Graeff, 1999).

Segundo a quinta edição do Manual de Diagnósticos e Estatísticas das Doenças Mentais, a ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes transtornos, com diferentes sintomas, decursos temporais e respostas terapêuticas (American Psychiatric Association, 2013). Dentre estes transtornos, destaca-se aqui o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), que tem como principal característica uma preocupação persistente e excessiva que tende a ocorrer na maioria dos dias, por cerca de seis meses, acompanhada de, pelo menos, três dos seguintes sintomas físicos e emocionais: inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e/ou perturbações do sono (American Psychiatric Association, 2013).

Estudos epidemiológicos mostram que os transtornos de ansiedade estão dentre os transtornos mentais mais prevalentes na sociedade, sendo o mais frequente em todas as idades (Greinier *et al.*, 2018). Locke *et al.* (2015) identificaram que a prevalência de TAG em adultos americanos de 18 a 64 anos de idade era de 2,9%, sendo 7,7% dessa população de mulheres e 4,6% de homens. Além disso, em algumas regiões do Brasil, a prevalência por ano de transtornos de ansiedade foi de 19,9%, demonstrando a alta persistência destes transtornos na população (Mangolini *et al.*, 2019). Esta alta prevalência na população em geral faz com que estes transtornos estejam entre os maiores problemas de saúde pública, gerando grande custo econômico (Yonkers *et al.*, 1998; Bereza *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2014).

1.2 COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E A ANSIEDADE

O estudo da neurobiologia dos transtornos de ansiedade através da utilização de modelos animais tornou-se possível a partir de seu enquadramento dentro de uma perspectiva evolutiva. Uma célebre obra, “A expressão das emoções no homem e nos animais”, publicada por Darwin 13 anos depois de seu trabalho mais conhecido, “A origem das espécies” descreve que as emoções humanas são uma herança da evolução, conseqüentemente, são comuns aos animais e aos homens (Darwin, 2000).

Dentro desta perspectiva, torna-se possível depreender que emoções, tais como o medo e ansiedade, possuem valor adaptativo e evolutivo e teriam suas origens biológicas nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representem perigo ou ameaça à sobrevivência (Graeff, 1999). Ainda que os comportamentos de defesa adotados, bem como os estímulos desencadeantes, variem de acordo com a espécie, algumas estratégias de defesa padronizadas são adotadas (Graeff, 1999).

Nesta direção, Caroline e Robert Blanchard conduziram uma série de experimentos com o intuito de compreender as estratégias defensivas adotadas por ratos e camundongos, sejam eles selvagens ou de laboratório, frente a situações de perigo, que podem ser reais ou incertas (para revisão ver: Blanchard *et al.*, 1993; Blanchard; Blanchard, 1988; Blanchard; Griebel; Blanchard, 2003). Brevemente, os resultados destes estudos levaram à definição de três níveis de defesa, caracterizados de acordo com a distância entre a fonte de perigo e o indivíduo e a característica do estímulo ameaçador (real x potencial, ex. o confronto com um predador, ou a exposição a estímulos relacionados a esse predador, como o odor e/ou fezes e urina). São eles:

- I. Potencial: caracterizada pela incerteza do perigo, onde as estratégias comportamentais observadas envolvem a exploração cautelosa e hesitante, descritas como uma “avaliação de risco”. Fornece uma medida indireta relacionada à ansiedade
- II. O segundo nível de defesa, nomeado “distal”, consiste na presença de uma ameaça, porém ainda em uma distância segura do animal, gerando respostas de fuga ou congelamento, relacionadas ao medo.
- III. Já o terceiro e último nível é atribuído a uma ameaça proximal, na qual o predador/estímulo aversivo encontra-se muito próximo ou em contato com a

presa/indivíduo, gerando respostas de fugas explosivas ou ataques defensivos e está relacionada ao pânico.

A relação entre os níveis de defesa descritos acima e os diferentes transtornos de ansiedade é sustentada por experimentos de validação farmacológica (para revisão ver Blanchard *et al.*, 2011). Por exemplo, o tratamento crônico com fluoxetina (inibidor seletivo da recaptção de serotonina – ISRS) e imipramina (antidepressivo tricíclico), drogas eficazes tanto no tratamento do TAG como no transtorno do pânico, inibe tanto os comportamentos de avaliação de risco e esquiva como o de fuga (Blanchard *et al.*, 2001). Essa habilidade das drogas efetivas no tratamento do TAG em modular os comportamentos de avaliação de risco e esquiva suportam a visão de que estes comportamentos estão relacionados à ansiedade (Blanchard *et al.*, 2011).

1.3 SUBSTRATOS NEURAIIS RELACIONADOS À ANSIEDADE

Ainda na década de 90, estudos buscaram investigar os substratos neurais recrutados durante as respostas defensivas. Nesta direção, Graeff (1981) propôs a existência do sistema cerebral aversivo (SCA), que compreende estruturas límbicas relacionadas com as estratégias de defesa observadas em situações ameaçadoras ou de perigo iminente, tais como hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e a amígdala (Deakin; Graeff, 1991; Graeff, 1994). Assim, em situações onde a ameaça é apenas potencial ou distal, estruturas tais como o córtex pré-frontal, o hipocampo e a amígdala são ativadas, enquanto a defesa proximal envolve a ativação principalmente do hipotálamo e a SCPd (Zangrossi; Graeff, 2010).

Em paralelo a estes estudos, o psicólogo inglês Gray, publicou em 1982, no livro intitulado “Neuropsychology of Anxiety”, com os resultados oriundos de pesquisas que mostravam que os comportamentos derivados de lesões hipocampais e os decorrentes da ação de drogas ansiolíticas clássicas (barbitúricos e benzodiazepínicos) eram bastante similares, propondo a participação do sistema septo-hipocampal em comportamentos defensivos associados à ansiedade.

Diante destas descobertas, McNaughton e Gray (2000) propuseram a existência de um sistema de inibição comportamental (SIC), o qual teria como função emitir respostas adequadas frente à estímulos e/ou situações aversivas que geram conflito do tipo aproximação-esquiva, como as desencadeadas por sinais

condicionados de punição, estímulos inatos de perigo/ameaça ou de novidade e sinais de frustração. A principal representação neural do SIC é o sistema septo-hipocampal, que tem como principal função a detecção deste conflito e que quando ativado promove a inibição do comportamento em curso e também eleva os níveis de vigilância e atenção.

1.4 HIPOCAMPO, SEROTONINA E ANSIEDADE

O hipocampo é uma estrutura bilateral, alongada e curva, que em humanos, se insere nas faces mediais de cada lobo temporal (Guyton, 2008). Em roedores, o hipocampo se estende ao longo do eixo longitudinal, sendo dividido em hipocampo dorsal (HD) e hipocampo ventral (HV). Ambos os polos hipocampais são compostos por 4 regiões: giro denteado (GD) e as três regiões do Corno de Amnon (CA1, CA2, CA3). O GD recebe projeções principalmente do córtex entorrinal, e emite projeções para CA3 e CA2, que por sua vez inervam CA1, a área de saída do hipocampo (Amaral; Lavenex, 2007; Dremencov *et al.*, 2003).

Em 1998, Moser e Moser propuseram que o hipocampo não atua como uma estrutura unitária. Esta proposta estaria embasada em estudos de neuroanatomia que demonstravam padrões diferentes de conexão estabelecidos por cada polo hipocampal e estudos de lesões e eletrofisiologia que atribuíram diferentes funções primárias para o HD e o HV. Assim, o HD projeta e recebe aferências de áreas corticais importantes para mediação de processos cognitivos, sendo primariamente envolvido em funções como o aprendizado, a memória e a navegação espacial. Já o HV estabelece conexões bidirecionais com áreas subcorticais, tais como a amígdala e o hipotálamo, exercendo um papel essencial na regulação das emoções, do estresse e da ansiedade (para revisão, ver Moser; Moser, 1998; Bannerman *et al.*, 2004; Fanselow; Dong, 2009).

Por outro lado, evidências também sugerem que isso pode ser uma simplificação excessiva uma vez que diversos estudos farmacológicos já demonstraram a participação do HD nos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade (Guimarães *et al.*, 1993, Andrews *et al.*, 1994, Romaniuk *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2008; Almada *et al.*, 2009). Além disso, Kheirbek e colaboradores (2013), utilizando a técnica de optogenética demonstraram que o silenciamento de populações neurais específicas do HD e do HV levam a respostas comportamentais distintas. Assim, o silenciamento dos neurônios do GD dorsal, mas não ventral,

prejudica a aquisição do condicionamento de congelamento evocado pelo contexto, indicando um efeito ansiolítico, e somente no polo ventral esse procedimento diminui a expressão das respostas defensivas da ansiedade inata medidas no labirinto em cruz elevado (LCE) e testes em campo aberto (Kheirbek *et al.*, 2013).

O processamento de informações no hipocampo é complexo e influenciado por diversos neuromoduladores e neurotransmissores, dentre eles destaca-se a serotonina, conhecida por sua importância na regulação do humor e dos comportamentos defensivos (Mohammad-Zadeh; Moses; Gwaltney-Brant, 2008; Dale *et al.*, 2016).

Os estudos pioneiros que envolvem a serotonina e a ansiedade foram fundamentados em modelos animais de conflito. Nesses modelos, o comportamento operante do animal é simultaneamente reforçado pela liberação de uma recompensa como, por exemplo, um alimento, e inibido pela exposição a um estímulo aversivo, como um choque elétrico (Geller; Seifer, 1960). Estudos utilizando estes modelos demonstraram que a estimulação do sistema serotoninérgico acionaria o sistema de punição cerebral induzindo um aumento na resposta de inibição comportamental, sendo, portanto, ansiogênico (Robichaud; Sledge, 1969; Geller; Blum, 1970; Graeff; Schoenfeld, 1970; Wise *et al.*, 1972). No entanto, outros estudos utilizando como modelo a estimulação elétrica da SCPd, mostravam um papel antiaversivo do neurotransmissor na modulação das respostas defensivas relacionadas ao pânico, como a fuga (Kiser; Lebovitz, 1975; Schenberg; Graeff, 1978; Kiser *et al.*, 1978).

Neste sentido, buscando explicar o papel controverso da serotonina na ansiedade, Deakin e Graeff (1991) propuseram a teoria do papel dual da serotonina, na qual a serotonina facilitaria a expressão das respostas defensivas relacionadas à ansiedade (ex. comportamentos de avaliação de risco e a esquiva inibitória), e ao contrário, inibiria as respostas defensivas relacionadas ao pânico, como a fuga. Diversos estudos buscando investigar quais substratos neurais estariam associados a essa dualidade observaram que a serotonina era capaz de facilitar a resposta de esquiva inibitória por agir em estruturas pró-encefálicas, como o sistema septo-hipocampal e a amígdala, e inibiria a resposta de fuga por agir em estruturas como a SCPd e o hipotálamo dorsomedial (para revisão, ver Graeff; Zangrossi, 2010; Zangrossi; Graeff, 2014).

O hipocampo é um dos principais alvos das projeções serotoninérgicas, com origem tanto no núcleo mediano da rafe (NMR) quanto do núcleo dorsal da rafe (NDR)

(O'keefe; Nadel, 1978; Imai *et al.*, 1986; Molliver, 1987; West, 1990; Mckenna; Vertes, 2001; Dremencov *et al.*, 2003; Amaral; Lavenex, 2007). Curiosamente, no hipocampo, assim como em outras estruturas, as fibras serotoninérgicas não possuem contato sinápticos diretos e, em muitos casos, os receptores serotoninérgicos foram detectados em neurônios que não recebem inervação serotoninérgica. Isso sugere que a serotonina é liberada difusamente por transmissão de volume e atua mais como um neuromodulador cuja função pode ser manter a homeostase (para revisão ver Dale *et al.*, 2016).

A diversidade e especificidade da ação da serotonina na modulação das respostas defensivas pode ser atribuída à existência de 14 subtipos de receptores serotoninérgicos, que estão agrupados em 7 famílias, com características e padrões de expressão diferentes nas estruturas encefálicas. No hipocampo, ao menos 9 subtipos de receptores serotoninérgicos são encontrados expressos tanto em células excitatórias como em células inibitórias (Tanaka *et al.*, 2012; Dale *et al.*, 2016).

Tanaka e colaboradores (2012), utilizando a técnica de hibridização *in situ* em camundongos, observaram que o perfil de expressão dos RNAm era diferente ao longo do eixo longitudinal, assim como nas distintas sub-regiões do hipocampo. Em termos de 5-HT_{2C}, foco principal do presente trabalho, este estudo indicou a expressão deste receptor ao longo de todo o eixo longitudinal do hipocampo, porém com sua maior concentração na camada CA3 do HV.

O receptor 5-HT_{2C} é um receptor metabotrópico acoplado a uma proteína Gq. Quando ativado, promove um aumento dos níveis de cálcio intracelular, resultando em uma despolarização neuronal subsequente (Hoyer; Hannon; Martin, 2002; Van Oekelen; Luyten; Leisen, 2003). Embora apresente uma semelhança com os receptores da família 5-HT₂, compartilhando, por exemplo, a característica excitatória, o receptor 5-HT_{2C} se distingue por ser o único receptor metabotrópico a apresentar isoformas que teriam sua origem em modificações na transcrição do RNAm durante sua síntese (Barnes; Sharp, 1999; Bockaert *et al.*, 2010).

Sabe-se que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} em áreas límbicas, como por exemplo, o núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA) e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (Campbell; Merchant, 2003; Vicente; Zangrossi, 2012; Yamashita; Bortoli; Zangrossi, 2011) tem sido associada ao desencadeamento da ansiedade.

No diz respeito ao papel destes receptores no HV, é surpreendente que poucos estudos até agora tenham abordado a participação deste receptor na modulação dos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade (Alves *et al.*, 2004; Scarpelli *et al.*, 2008; Ohmura *et al.*, 2019). Por exemplo, Alves e colaboradores (2004), utilizando o LCE, demonstraram que administração intra-HV de dois agonistas de receptores 5-HT_{2C}, o MK-212 e o TFMPP, diminuiu o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos, caracterizando um efeito ansiogênico. Mais recentemente, Ohmura e colaboradores (2019) utilizando optogenética, demonstraram que a estimulação do NMR, fonte de inervação serotoninérgica para o hipocampo, aumenta a ansiedade no LCE, e que este efeito era bloqueado pela injeção prévia no HV do antagonista de receptores 5-HT_{2C}, SB-242084.

Diante do exposto, para investigar a generalidade destes resultados obtidos previamente no modelo do LCE, neste estudo investigamos os efeitos da injeção intra-HV de drogas que interagem com os receptores 5-HT_{2C}, mais especificamente o MK-212 e o SB-242084, agonista e antagonista desses sítios de ligação, respectivamente. Como modelo experimental, escolhemos o teste de beber punido de Vogel, que é um modelo experimental preditivo de ansiedade baseado no conflito entre um comportamento motivado e um estímulo aversivo. Neste teste, os animais previamente privados de água são expostos a uma caixa com acesso ao consumo deste líquido, porém ao beber a água o animal recebe choques elétricos na língua, gerando um conflito do tipo aproximação-esquiva, com a consequente inibição do comportamento em curso (para revisão, ver Millan, 2003).

De acordo com os resultados obtidos, também procuramos avaliar no teste de Vogel o impacto causado pelo tratamento com uma droga ansiolítica padrão, a fluoxetina (ISRS), sobre a reatividade dos receptores 5-HT_{2C} no HV.

É digno de nota que, tanto em humanos, como em animais experimentais, o efeito ansiolítico de drogas antidepressivas, como a fluoxetina, só ocorre após o tratamento crônico, sendo importante ressaltar que no início do tratamento essas drogas podem aumentar a ansiedade (Millan, 2005, Vicente e Zangrossi 2012) Evidências na literatura sugerem que para a observação do efeito ansiolítico dessas drogas é necessário haver um aumento na disponibilidade de serotonina na fenda sináptica, que é atingida somente após alterações neuroplásticas em autorreceptores inibitórios do subtipo 5-HT_{1A} localizados nos corpos de neurônios 5-HT localizados nos núcleos da rafe (Blier; El Mansari, 2013). De acordo com Millan a ativação de

receptores 5-HT_{2C} em áreas límbicas responderia pelo efeito ansiogênico decorrente do aumento de 5-HT, ainda que moderado, causado pela administração aguda ou de curto-prazo de antidepressivos. Ao longo do tempo, haveria uma dessensibilização desses receptores e paralelamente uma maior disponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica seria alcançada, em função da dessensibilização dos autorreceptores inibitórios 5-HT_{1A} na rafe (para revisão, ver Millan, 2003; Millan 2005).

Trabalhos prévios de nosso laboratório (Vicente; Zangrossi, 2012, 2014) mostram a participação dos receptores 5-HT_{2C} localizados no núcleo basolateral da amígdala (BLA), uma outra área encefálica criticamente associada à ansiedade, no efeito ansiogênico decorrente da administração a curto-prazo de duas drogas antidepressivas, a fluoxetina e imipramina. Esta última droga é um composto tricíclico que atua inibindo a receptação tanto da serotonina como da noradrenalina. Estes estudos mostraram ainda que após o tratamento crônico, ocorre a dessensibilização funcional destes receptores, o que favoreceria o aparecimento do efeito ansiolítico destas drogas. Isto estaria de acordo com a proposta de Millan (2005) que ressalta a importância da dessensibilização de tais receptores em áreas límbicas, como mencionado acima, para a mudança do efeito ansiogênico para o ansiolítico observado após o tratamento crônico.

Em relação ao hipocampo ainda que não se diferencie o polo hipocampal, alguns trabalhos na literatura sugerem que o tratamento crônico com antidepressivos, tais como imipramina e fluoxetina, altere a expressão dos receptores 5-HT_{2C} (Barbon *et al.*, 2011). Além disso, tem sido proposto que o aumento da neurotransmissão serotoninérgica nesta região é necessária para que tais antidepressivos apresentem seus efeitos terapêuticos (para revisão, ver Blier; El Mansari, 2013). Ainda que os trabalhos mencionados acima sugiram a ocorrência de uma relação entre os receptores 5-HT_{2C} e o mecanismo de ação dos antidepressivos, ao nosso conhecimento, nenhum estudo, até o momento, investigou as consequências do tratamento crônico com antidepressivos nos efeitos comportamentais associados à ansiedade mediados por receptores 5-HT_{2C} no HV.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estender as investigações acerca dos efeitos na ansiedade desencadeados pela manipulação farmacológica de receptores 5-HT_{2C} no HV.

2.2 ESPECÍFICOS

Investigar a generalidade dos efeitos obtidos previamente no modelo do LCE, avaliando as consequências de injeções intra-HV do agonista e antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, MK-212 e SB-242084, respectivamente, em ratos submetidos ao teste de beber punido de Vogel.

Investigar, também no teste de Voges, se o tratamento crônico com a fluoxetina altera a resposta comportamental causada pela injeção de MK-212 no HV.

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley machos (220-380 gramas), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP, onde ficaram alojados (5 animais/caixa) em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm), forradas com serragem e tiveram livre acesso a água e a comida. O biotério foi mantido com temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de claro-escuro de 12 horas, sendo o período iluminado das 7:00 às 19:00 horas com intensidade de 60 lux. Todos os procedimentos adotados neste trabalho foram aprovados pela CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Registro 140/2020).

3.2 DROGAS

MK-212 [cloridrato de 6-Cloro-2-(1-piperazinil) pirazina; Tocris, EUA] e 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] e fluoxetina (cloridrato de fluoxetina- Cristália, Brasil). As drogas utilizadas foram dissolvidas em salina estéril 0,9%, exceto a fluoxetina que foi diluída em salina com 2% de Tween 80 (Sigma, EUA).

3.3 APARATOS

3.3.1 Teste do beber punido de Vogel

O conjunto do aparato empregado no teste é composto por uma caixa de acrílico transparente (42 x 25 x 20 cm), que possui uma grade metálica no assoalho e um bebedouro acoplado (contendo água), que projeta um bico, também metálico, para o seu interior, sendo que esse conjunto do aparato fica dentro de uma caixa acústica. O contato do animal com o bico e o assoalho fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (Insight, Brasil), que produz 7 pulsos/s quando o animal está em contato com os dois componentes. Cada pulso foi considerado uma lambida e a cada 20 lambidas, o animal recebeu, através do bico, um choque elétrico de 0,5 mA, durante dois segundos. O sensor registrou o número de lambidas e de choques durante o período do teste (3 minutos).

3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich) a 2,5% (10mL/kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Após a tricotomia da região da cabeça, foi realizada antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 2% (PVPI) e injeção subcutânea do anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol® 100, S.S. White-Brasil). Foi realizada uma incisão longitudinal dos tecidos cutâneos e subcutâneos, tal qual a remoção do periósteo por raspagem a fim de expor o crânio. Através de orifícios na superfície craniana, perfurados por uma broca, cânulas guias de 0,6 mm de diâmetro externo e 12 mm de comprimento foram implantadas bilateralmente no encéfalo. As cânulas foram direcionadas ao HV de acordo com as seguintes coordenadas: HV: antero-posterior = $\pm 5,0$ mm, latero-lateral = $\pm 5,2$ mm e dorso-ventral = $\pm 4,0$ mm, ambas com inclinação da haste = 0° e tendo o Bregma como referência (Paxinos e Watson, 2007). Após o posicionamento das cânulas, estas permaneceram fixadas aos orifícios através de um capacete de acrílico feito de resina autopolimerizante (Jet), estabilizado por um parafuso odontológico fixado ao crânio. Dois fios de aço (0.2 mm de diâmetro) foram colocados dentro das cânulas para evitar a obstrução das mesmas.

Ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil), com o propósito de prevenir possíveis infecções. Ainda, foi administrado um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética, a fluxinina meglumina (2,5 mg/mL/kg, s.c).

3.5 PROCEDIMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Em todos os experimentos, as injeções intra-HV foram feitas simultaneamente nos dois hemisférios cerebrais por meio de duas agulhas odontológicas (Mizzy, 15 mm), inseridas através das cânulas-guia até atingir o alvo a 3,0 mm abaixo da extremidade da cânula. Cada agulha odontológica foi conectada a uma microseringa (Hamilton 701-RN, EUA) de 10 μ l, através de um tubo de polietileno (PE-10), que foi preenchido com água destilada. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno auxiliou na verificação da microinjeção. Para controle do volume e do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba microinjetora digital (Harvard Apparatus, modelo 55-

2222), programada para injetar 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.

3.5.1 Teste do beber punido de Vogel

Para as análises comportamentais, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste do beber punido de Vogel. Dois dias antes do início dos testes, os animais foram manuseados pelo experimentador uma vez ao dia durante 5 minutos. Paralelamente, os animais foram também privados de água por 48 horas antes da avaliação no teste. Após as primeiras 24 horas, os animais passaram por uma sessão treino na caixa de execução do teste, no qual obtiveram acesso à água livremente por um período de 3 minutos. No dia seguinte à sessão treino, após a administração das drogas, os animais foram individualmente colocados na caixa teste por 3 minutos, contados a partir do momento em que o animal encontrou o bico do bebedouro. Durante este período de tempo, a cada 20 lambidas, os animais receberam, por meio do bico do bebedouro, um choque de 0,5 mA com duração de dois segundos.

3.5.1.1 Experimento 1: Efeitos da manipulação farmacológica de receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral em ratos submetidos ao teste de Vogel

No experimento 1A, grupos independentes de animais receberam, de maneira randomizada, microinjeções bilaterais simultâneas intra-HV de salina ou do agonista de receptores 5-HT_{2C}, MK-212, nas doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol. Já no experimento 1B, os animais receberam microinjeções intra-HV de salina ou SB-242084 nas doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol. Dez minutos após receberem os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste, conforme descrito acima.

3.5.1.2 Experimento 2: Tratamento crônico com a fluoxetina sobre o efeito causado pela injeção intra-HV do MK-212 ao teste de Vogel

No experimento 2, grupos independentes de animais foram tratados durante 21 dias com injeções intraperitoneais de veículo ou fluoxetina (10mg/kg/dia). Entre o 14° e o 16° dia de tratamento, foi realizada a cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guias direcionadas ao HV, conforme descrito acima. No dia do teste, os animais receberam a última injeção de fluoxetina ou veículo, e três horas depois,

receberam injeção intra-HV de salina ou MK-212 (1nmol/ 0,2 ul). Os seguintes grupos foram formados: VEI/SAL, FLU/SAL, VEI/MK-212, FLU/MK-212. Dez minutos após a última microinjeção, os animais foram submetidos ao teste de Vogel, conforme descrito.

3.5.2 Análise Histológica

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uretana 25% (10 mL/kg) e submetidos à microinjeção no HV de 0,2 µl do corante azul de Evans a 1% e posterior perfusão intracardíaca com salina (NaCl a 0,9%) e formol (10%). Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e fixados em formol a 10%. Posteriormente, os encéfalos foram cortados em secções coronais de 50µm de espessura em um criostato (Leica CM1850) para verificação microscópica do sítio de microinjeção, segundo as fotos micrografias do atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram incluídos na análise estatística os animais que tiverem a ponta da agulha de microinjeção localizada dentro do HV.

3.5.3 Análise de Dados

Os dados obtidos nos experimentos acima foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, tendo o tratamento como fator independente. Quando apropriado foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

4 RESULTADOS

A figura 1 mostra os sítios de injeções das drogas no HV dos animais submetidos ao teste do beber punido de Vogel.

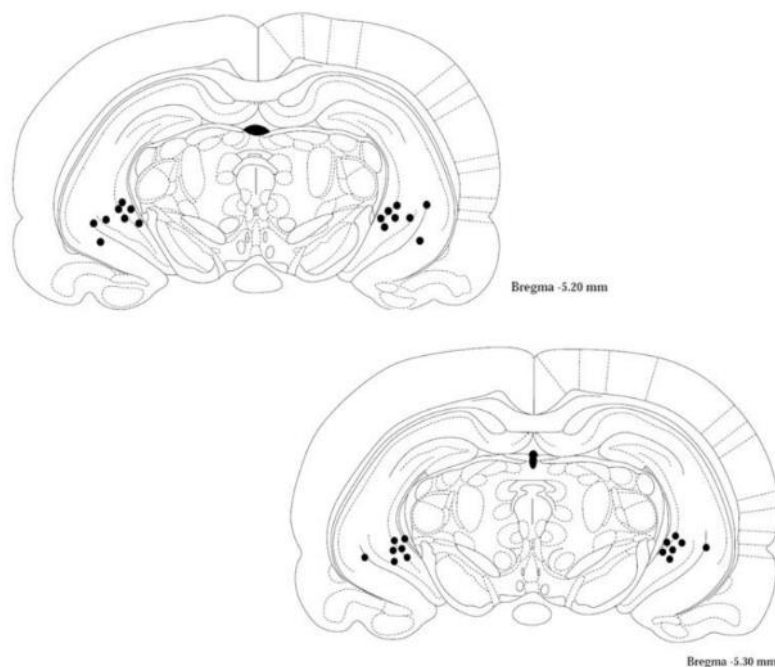


Figura 1: Representação dos sítios de microinjeção no HV observados em todos os experimentos, (HV: Bregma -5,20 mm a 5,30mm) conforme o Atlas Paxinos e Watson (2007). O número total de pontos é menor que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

4.1 EXPERIMENTO 1A: CURVA DOSE-RESPOSTA MK-212

O gráfico 1 mostra que a injeção intra-HV de MK-212 alterou o número de lambidas punidas no teste de conflito de Vogel [$F(3,22) = 5,769$; $p < 0,05$]. O post-hoc de Duncan mostrou que o tratamento com o MK-212, nas doses de 0,1 e 1 nmol, diminuiu o número de lambidas punidas quando comparado ao grupo controle, indicando um efeito do tipo ansiogênico.

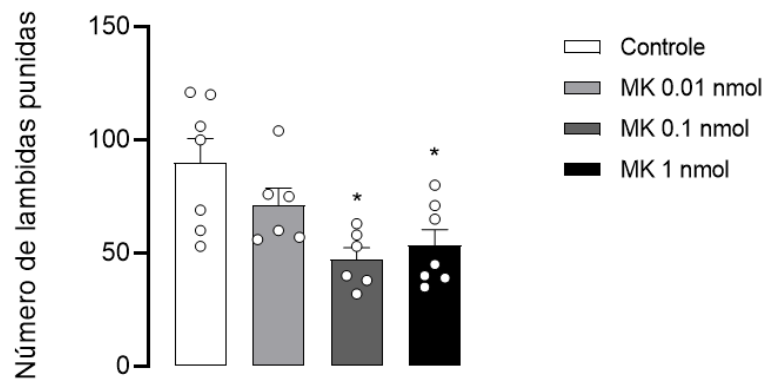


Figura 2: Efeito (média + EPM) da injeção intra-HV de MK-212, ou salina no número de lambidas punidas no teste de beber punido de Vogel. n= 6-7; *p<0,05 comparado ao grupo controle.

4.2 EXPERIMENTO 1B: CURVA DOSE-RESPOSTA SB-242084

O gráfico 2 mostra que a injeção intra-HV de SB-242084 altera o número de lambidas punidas no teste do beber punido de Vogel [$F(3,14) = 4,097$; $p < 0,05$]. O post-hoc mostrou que o tratamento com o SB-242084 na dose de 1 nmol aumentou o número de lambidas punidas quando comparado as doses de 0,01 e 0,1 nmol, porém não há diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle.

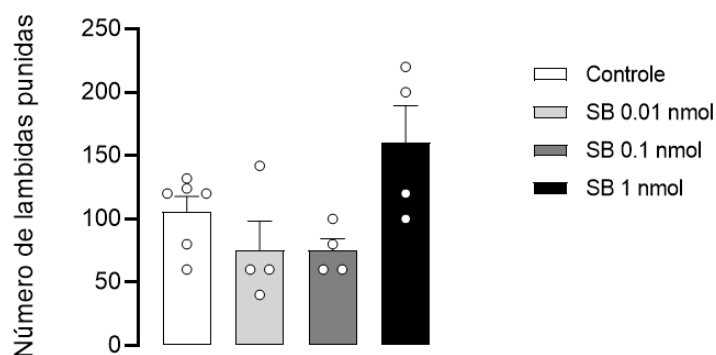


Figura 3: Efeito (média + EPM) da injeção intra-HV de SB-242084, ou salina no número de lambidas punidas no teste de beber punido de Vogel. n= 4-6 *p<0,05 comparado ao grupo controle.

4.3 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM FLUOXETINA SOBRE O EFEITO CAUSADO PELA INJEÇÃO INTRA-HV DE MK-212 NO TESTE DO BEBER PUNIDO DE VOGEL

O gráfico 3 ilustra o efeito causado no teste de Vogel pela administração combinada de fluoxetina (i.p) e intra-HV de MK-212 em animais submetidos ao teste do beber punido de Vogel. A ANOVA mostra que, embora não haja um efeito significativo entre os grupos [$F(3,17) = 2,44$; $p=0.01$], o teste t de Student mostra que haver uma diferença significativa entre os animais VEI/SAL e VEI/MK, como observado no experimento 1A.

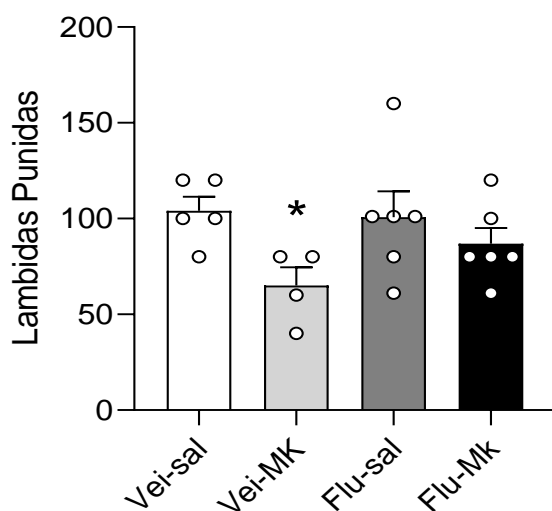


Figura 4: Efeito (média + EPM) do tratamento crônico com fluoxetina (10mg/kg, 21 dias, i.p) ou veículo 3 horas antes da injeção intra-HV de MK-212 (1 nmol) ou salina. $n= 4-6$. * $p<0.05$ na comparação (teste t) entre os grupos VEI/SAL e VEI/MK.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo procuramos verificar os efeitos causados pela manipulação farmacológica de receptores 5-HT_{2C} do HV em ratos submetidos ao teste de conflito de Vogel.

Os resultados obtidos mostram que a estimulação desses receptores com o agonista MK-212 diminuiu o número de lambidas punidas feitas para obter água, indicando um efeito ansiogênico. Já o antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, o SB-242084 foi destituído de efeito, ainda que a dose mais elevada testada tendeu a aumentar o número de lambidas punidas.

Estes resultados estão de acordo com estudos prévios conduzidos no LCE. Em um destes trabalhos, Alves e colaboradores (2004) mostraram que a administração intra-HV de dois agonistas dos receptores 5-HT_{2C}, o TFMPP e o MK-212, em ratos, diminui a porcentagem do número de entradas por esses animais nos braços abertos do aparato, evidenciando um aumento de ansiedade. Contudo, ao aplicar o mesmo tipo de tratamento no HD, os autores não identificaram alterações nas respostas comportamentais expressas por esses animais.

Já em um estudo mais recente, Ohmura *et al.*, (2019), utilizando da técnica de optogenética, demonstraram que a estimulação do NMR aumenta a ansiedade em animais submetidos ao LCE. Este efeito é decorrente de um aumento de serotonina no HV e da ativação dos receptores 5-HT_{2C}, uma vez que o antagonismo farmacológico prévio destes receptores no HV, pelo SB-242084, bloqueia o efeito ansiogênico causado pela estimulação do NMR. Neste estudo, os autores também observaram que os camundongos obtidos através de um cruzamento genético entre animais bitransgênicos, ou seja, que não apresentavam a expressão dos receptores 5-HT_{2C}, mas expressavam o neurônio serotoninérgico central específico (ChR2 – C128S), teve o efeito ansiogênico causado pela liberação de serotonina no HV sendo completamente revertido.

Ainda que escassa, a literatura atual também traz alguns resultados incongruentes e até mesmo contraditórios quanto a participação dos receptores 5-HT_{2C} no HV. Cornélio e Nunes-de-Souza (2007), em sua pesquisa sobre a ação do m-CPP, um agonista de receptores 5-HT_{2B/2C}, em camundongos submetidos ao LCE, observaram que a administração intra-HV desse composto não exerce efeito sobre a expressão de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade.

A diferença entre esse estudo e os estudos mencionados anteriormente, que revelaram o efeito ansiogênico dos receptores 5-HT_{2C} no HV, pode decorrer da utilização de diferentes espécies animais, bem como ser atribuído ao fato da utilização de um agonista menos seletivo para os receptores 5-HT_{2C} (Griebel, 1995; Knight *et al.*, 2004). O m-CPP possui afinidade por outros receptores de serotonina, além dos receptores 5-HT_{2C} (Knight *et al.*, 2004), o que pode explicar os resultados contraditórios observados nos diferentes estudos.

É interessante ressaltar aqui que um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (Sant'Ana *et al.*, 2019) mostrou que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} no polo dorsal do hipocampo (HD) leva a um efeito do tipo ansiolítico, e não ansiogênico, como aqui relatado. Mais especificamente, os autores observaram que a administração intra-HD de dois agonistas dos receptores 5-HT_{2C}, o MK-212 (0,01 e 0,1 nmol) e o RO-600175 (20 e 40 nmol) prejudicou a aquisição da resposta de esquiva inibitória em animais submetidos ao labirinto em T elevado (LTE). Em contrapartida, o bloqueio desses receptores, em decorrência da injeção intra-HD de SB-242084, nas doses de 0,1 e 0,01 nmol, facilitou a aquisição da resposta de esquiva inibitória nos animais testados, caracterizando, portanto, um efeito do tipo ansiogênico (Sant'Ana *et al.*, 2019).

Também é digno de nota que, como observado aqui com o HV, a estimulação de receptores 5-HT_{2C} em uma outra estrutura chave na mediação da ansiedade, o núcleo BLA da amígdala, também aumenta a ansiedade. Os estudos desenvolvidos por Vicente e Zangrossi (2012; 2014) mostram que a injeção intra-BLA de MK-212 em ratos facilitou a aquisição da esquiva inibitória no LTE e diminuiu a porcentagem de tempo em que esses animais passaram no compartimento iluminado no teste de transição claro-escuro, indicando um efeito ansiogênico. Por outro lado, a administração intra-BLA de SB-242084 prejudica tal resposta, enquanto que a administração prévia de uma dose sub-eficaz deste mesmo antagonista bloqueia o efeito ansiogênico causado pela microinjeção local de MK-212.

Um outro receptor presente no hipocampo, que parece desempenhar um papel marcante na fisiopatologia da ansiedade, é o 5-HT_{1A}. Em um estudo também conduzido por nosso grupo de pesquisa, Hernandez *et al.*, 2021 observaram que, da mesma forma que ocorre com os receptores 5-HT_{2C}, este receptor exerce efeitos opostos dependendo da região hipocampal. Assim, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} no polo dorsal aumenta a ansiedade, enquanto sua ativação no polo ventral reduz a manifestação de comportamentos associados a essa emoção. Esses achados

levaram a hipótese de que a ação dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1A} no hipocampo seja contrabalanceada.

Com base nas evidências obtidas em nosso estudo sobre o hipocampo, uma das potenciais explicações para a dualidade de efeitos da serotonina nos receptores 5-HT_{2C}, a depender do polo hipocampal, é que esses receptores podem integrar microcircuitarias distintas nas sub-regiões. Em outras palavras, eles podem estar expressos em neurônios com diferentes fenótipos, como neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos e/ou nitrérgicos. Essa diversidade de fenótipos neuronais pode influenciar a resposta dos receptores 5-HT_{2C} a serotonina, resultando em efeitos opostos nas diferentes regiões do hipocampo (Pompeiano *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 2010). Investigações futuras, utilizando estudos de imunistoquímica com dupla marcação para neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos e/ou nitrérgicos e para receptores 5-HT_{2C} nos permitirão avaliar o fenótipo nos quais estes receptores estão localizados.

Além de ampliar as investigações sobre os efeitos comportamentais resultantes da manipulação farmacológica dos receptores 5-HT_{2C} no HV, o presente estudo também teve como objetivo avaliar o papel desses receptores no mecanismo de ação dos antidepressivos. Baseado em estudos mostrando a participação destes receptores no mecanismo da ação ansiogênica e ansiolítica de drogas como a fluoxetina e imipramina (Millan, 2005; Vicente; Zangrossi, 2014; Hernandez *et al.*, 2021), buscamos investigar se o tratamento crônico prévio com fluoxetina, em uma dose subeficaz, seria capaz de alterar o efeito ansiogênico causado pela administração de MK-212 no HV.

Conclusões mais sólidas sobre os resultados obtidos neste estudo ainda não são possíveis, devido ao pequeno número de animais avaliados até o momento. Mas, os dados obtidos já permitem algumas observações importantes. Como no experimento 1A, a administração intra-HV de MK-212 no experimento 2 também diminuiu o número de lambidas punidas dos animais, indicando um efeito ansiogênico. Isto, no entanto, não parece ocorrer naqueles animais tratados com a fluoxetina, o que pode ser indicativo de dessensibilização dos receptores 5-HT_{2C} nesta área hipocampal. Se confirmada esta predição, outros estudos deverão ser realizados para verificar se esta alteração é devida a uma diminuição na expressão e/ou função destes sítios de ligação.

É importante ressaltar que tal fenômeno ocorre no núcleo BLA da amígdala. Como mencionado acima, nesta também importante área de mediação da ansiedade, a estimulação dos receptores 5-HT_{2C} aumenta a ansiedade. Assim, a aplicação prévia intra-BLA do antagonista destes receptores não apenas bloqueia o efeito ansiogênico promovido pelo aumento da serotonina nessa região, como antagoniza o efeito ansiogênico agudo causado pela imipramina (5 ou 15 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) avaliada no teste de conflito de Vogel e imipramina no LTE (Vicente e Zangrossi, 2012). Ao realizar o tratamento crônico (21 dias) com imipramina (15 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg), Vicente e Zangrossi (2014) observaram que os efeitos ansiogênicos do MK-212 foram anulados, indicando uma possível dessensibilização dos receptores 5-HT_{2C} no BLA e uma possível sensibilização dos receptores 5-HT_{1A} neste núcleo, estes dois mecanismos simultâneos poderiam ser assim subjacentes ao efeito ansiolítico dos antidepressivos (Vicente; Zangrossi, 2014; Millan, 2005).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que a ativação de receptores 5-HT_{2C} no HV causa efeito ansiogênico no teste de beber punido de Vogel, corroborando achados prévios da literatura, conduzidos todos em um único teste, o LCE. Ainda que preliminares, os resultados apontam que este efeito ansiogênico pode ser diminuído pelo tratamento sistêmico e crônico com uma droga ansiolítica padrão, a fluoxetina.

REFERÊNCIAS

- ALMADA, R. C., BORELLI, K. G., ALBRECHET-SOUZA, L. BRANDÃO, M.L. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus–dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behavioural brain research*, v. 203, n. 2, p. 279-287, 2009.
- ALVES, S. H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioural pharmacology*, v. 15, n. 1, p. 37-43, 2004.
- AMARAL, D.; LAVENEX, P. Hippocampal neuroanatomy. In: ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. (ed.). *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, 2007, p. 37-114.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th edition, text revision. Washington, DC, 2013.
- 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 behaviours respectively. *European journal of pharmacology*, v. 264, n. 3, p. 259-264, 1994.
- 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. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004.
- BARBON, A.; ORLANDI, C.; LA VIA, L.; CARACCILO, L.; TARDITO, D.; MUSAZZI, L.; MALLEI, A.; GENNARELLI, M.; RACAGNI, G.; POPOLI, M.; BARLATI, S. Antidepressant treatments change 5-HT_{2C} receptor mRNA expression in rat prefrontal/frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychobiology*, v. 63, n. 3, p. 160-168, 2011.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 1999.
- BATESON, M., BRILOT, B., NETTLE, D. Anxiety: an evolutionary approach. *The Canadian Journal of Psychiatry*, v. 56, n. 12, p. 707-715, 2011.
- BAXTER, A. J.; VOS, T.; SCOTT, K. M.; FERRARI, A. J.; WHITEFORD, H.A. The global burden of anxiety disorders in 2010. *Psychological medicine*, v. 44, n. 11, p. 2363-2374, 2014.
- BEREZA, B. G.; MACHADO, M.; EINARSON, T. R. Systematic review and quality assessment of economic evaluations and quality-of-life studies related to generalized anxiety disorder. *Clinical Therapeutics*, v. 31, n. 6, p. 1279-1308, 2009.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. *Annual review of psychology*, v. 39, n. 1, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G. BLANCHARD, R. J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European journal of pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 97-116, 2003.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; POBBE R.; BLANCHARD, R. J. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 4, p. 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. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 7-8, p. 761-770, 2001.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural brain research*, v. 58, n. 1-2, p. 155-165, 1993.

BLIER, P.; EI MANSARI, M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 368, n. 1615, p. 20120536-20120543, 2013.

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.

CAMPBELL, B. M.; MERCHANT, K. M. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain research*, v. 993, n. 1-2, p. 1-9, 2003.

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. *Behavioural brain research*, v. 178, n. 1, p. 82-89, 2007.

DALE, E.; PEHRSON, A. L.; JEYARAJAH, T.; LI, Y.; LEISER, S. C.; SMAGIN, G.; OLSEN, C. K.; SANCHEZ, C. Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS spectrums*, v. 21, n. 2, p. 143-161, 2016.

DARWIN, C. A. *A expressão das emoções nos homens e nos animais*. Tradução Leon de Souza Lobo Garcia. São Paulo: Companhia das letras, 2000.

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

SANTOS, L. dos; ANDRADE, G. C. S.; ZANGROSSI, H. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT

neurons in the median raphe nucleus. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 4, p. 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. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 27, n. 5, p. 729-739, 2003.

FANSELOW, M. S.; DONG H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on para-chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of "conflict" behavior. *European journal of pharmacology*, v. 9, n. 3, p. 319-324, 1970.

GELLER, I.; SEIFER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia*, v. 1, p. 482-492, 1960.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, v. 10, n. 3, p. 207-217, 2010.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF F. G.; BRANDÃO M. L. (ed.). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5.ed. São Paulo: Lemos, p.135-178, 1999.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 14, n. 4-5, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, n. 4, p. 811-829, 1994.

GRAEFF, F. G.; SCHOENFELD, R. I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 173, n. 2, p. 277-283, 1970.

GRENIER, S.; DESJARDINS, F.; RAYMOND, B.; PAYETTE, M. C.; RIOUX, M. E.; LANDREVILLE, P.; GOSSELIN, P.; RICHER, M.J.; GUNTHER, B.; FOURNEL, M.; VASILADIS, H. M. Six-month prevalence and correlates of generalized anxiety disorder among primary care patients aged 70 years and above: Results from the ESA-services study. *International journal of geriatric psychiatry*, v. 34, n. 2, p. 315-323, 2019.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacology & therapeutics*, v. 65, n. 3, p. 319-395, 1995.

GUIMARÃES, F. S., DEL BEL, E.A, PADOVAN, C.M., MENDONÇA NETTO,S, TITZE DE ALMEIDA,R. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behavioural brain research*, v. 58, n. 1-2, p. 133-139, 1993.

GUYTON, A. C. *Neurociência Básica: Anatomia e Fisiologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HERNANDES, P. M.; BATISTELA, M. F.; VILELA-COSTA, H. H.; SANT'ANA, A. B.; KUMPEL, V. D.; TIRAPELLE, M. C.; PEDRO BOM, A. O.; ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI, H. Role of 5-HT_{1A} receptors in the ventral hippocampus in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 408, p. 113296, 2021.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 71, n. 4, p. 533-554, 2002.

IMAI, H.; STEINDLER, D.A.; KITAI, S.T. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 243, n. 3, p. 363-380, 1986.

JENSEN, N. H.; CREMERS, T. I.; SOTTY, F. Therapeutic potential of 5-HT 2C receptor ligands. *The Scientific World Journal*, v. 10, p. 1870-1885, 2010.

KHEIRBEK, M. A.; DREW, L. J.; BURGHARDT, N. S.; COSTANTINI, D. O.; TANNENHOLZ, L.; AHMARI, S. E.; ZENG, H.; FENTON, A. A.; HEN, R. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*, v. 77, n. 5, p. 955-968, 2013.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology & behavior*, v. 15, n. 1, p. 47-53, 1975.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M.; GERMAN, D. C. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology & behavior*, v. 15, n. 1, p. 47-53, 1975.

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-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 370, p. 114-123, 2004.

LOCKE, A., KIRST, N., SHULTZ, C. Diagnosis and management of generalized anxiety disorder and panic disorder in adults. *American family physician*, v. 91, n. 9, p. 617-624, 2015.

MANGOLINI, V.I., ANDRADE, L.H., WANG, Y.P. Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil: uma revisão de literatura. *Revista de Medicina*, v. 98, n. 6, p. 415-422, 2019.

MCKENNA, J.T.; VERTES, R.P. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain research bulletin*, v. 54, n. 6, p. 619-630, 2001.

MCNAUGHTON N.; GRAY, J.A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of affective disorders*, v. 61, n. 3, p. 161-176, 2000.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress In Neurobiology*, v. 70, n. 2, p. 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. *Therapies*, v. 60, n. 5, p. 441-460, 2005.

MOHAMMAD-ZADEH, L.F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, S.M. Serotonin: a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 31, n. 3, p. 187-199, 2008.

MOLLIVER, M.E. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *Journal of clinical psychopharmacology*, v. 7, n. 6, p. 3S, 1987.

MOSER, M.B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, v. 8, n. 6, p. 608-619, 1998.

OHMURA, Y.; TSUTSUI-KIMURA, I.; SASAMORI, H.; NEBUKA, M.; NISHITANI, N.; TANAKA, K.F.; YAMANAKA, A.; YOSHIOKA, M. Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*, v. 167, p. 107703, 2020.

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*. 6 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.

POMPEIANO, M.; PALACIO, J. M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Molecular brain research*, v. 23, n. 1-2, p. 163-178, 1994.

ROBICHAUD, R. C; SLEDGE, K. L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life sciences*, v. 17, n. 8, p. 965-969, 1969.

ROMANIUK, A., KOPROWSKA, M., KROTEWICZ, M., STRZELCZUK, M., WIECZOREK, M. Effects of 8-OHDPAT administration into the dorsal raphe nucleus and dorsal hippocampus on fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. *Behavioural brain research*, v. 120, n. 1, p. 47-57, 2001.

SANT'ANA, A. B.; VILELA-COSTA, H. H.; VICENTE, M. A.; HERNANDES, P. M.; ANDRADE, T. G. C. S.; ZANGROSSI JÚNIOR, H. Role of 5-HT_{2C} receptors of the dorsal hippocampus in the modulation of anxiety-and panic-related defensive responses in rats. *Neuropharmacology*, v. 148, p. 311-319, 2019.

SCARPELLI, G.; ALVES, S. H.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. M. Effects of two selective 5-HT_{2C} receptor-acting compounds into the ventral hippocampus of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, v. 1, p. 87-96, 2008.

SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 9, n. 3, p. 287-295, 1978.

TANAKA, K. F.; SAMUELS, B. A.; HEN, R. Serotonin receptor expression along the dorsal-ventral axis of mouse hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1601, p. 2395-2401, 2012.

VAN OEKELEN, D.; LUYTEN, W. H.; LEYSEN, J.E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life sciences*, v. 72, n. 22, p. 2429-2449, 2003.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology*, v. 79, p. 127-135, 2014.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 15, n. 3, p. 389-400, 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. *Progress in brain research*, v. 83, p. 13-36, 1990.

WISE, C. D.; BERGER, B. D.; STEIN, L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, v. 177, n. 4044, p. 180-183, 1972.

YAMASHITA, P. S. M.; BORTOLI, V. C. de; ZANGROSSI JÚNIOR, H. 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology*, v. 60, n. 2-3, p. 216-222, 2011.

YONKERS, K.A.; ZLOTNICK, C.; ALLSWORTH J.; WARSHAW, M.; SHEA, T.; KELLER, M.B. Is the course of panic disorder the same in women and men?. *American Journal of Psychiatry*, v. 155, n. 5, p. 596-602, 1998.

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

ZANGROSSI JÚNIOR, H.; GRAEFF, F.G. Anxiety: Animals Models. STOLERMAN, P. (ed.). Ian P. *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Springer Science & Business Media, 2010.