

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar - UNESP**

**EFEITO ANSIOLÍTICO DO ONDANSETRON, ANTAGONISTA DOS
RECEPTORES 5-HT₃, INJETADO NA AMÍDALA DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO E REEXPOSIÇÃO NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO**

ANA CLAUDIA NUNCIATO

**São Carlos, SP
Março, 2011**

ANA CLAUDIA NUNCIATO

**EFEITO ANSIOLÍTICO DO ONDANSETRON, ANTAGONISTA DOS
RECEPTORES 5-HT₃, INJETADO NA AMÍDALA DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO E REEXPOSIÇÃO NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar-Unesp, como parte dos requisitos para obtenção do título em Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Neurociência Comportamental.

Inserida na linha de pesquisa: Neurobiologia da Ansiedade.

Orientador: Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

**São Carlos, SP
Março, 2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N972ea

Nunciato, Ana Claudia.

Efeito ansiolítico do ondansetron, antagonista dos receptores 5-HT₃, injetado na amígdala de camundongos submetidos à exposição e reexposição no labirinto em cruz elevado / Ana Claudia Nunciato. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Psicofarmacologia. 2. Serotonina. 3. Amígdala. 4. Ansiedade. I. Título.

CDD: 615.78 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Dissertação de Mestrado de Ana Claudia Nunciato

Profª. Drª. Azair Liane Matos do Canto de Souza *Azair Liane Matos do Canto de Souza*

Profª. Drª. Carla Christina Medalha *CC*

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani *Carlos Cesar Crestani*

“mens sana in corpore sano.”

(Juvenal)

UMA CARTA À JUVENTUDE: I. P. Pavlov (1849-1936)

O que eu desejaria aos jovens de minha terra, que se dedicarão à ciência?

Primeiro de tudo – coerência. Desta condição muito importante para um trabalho científico frutífero, eu não posso falar sem emoção. Coerência, coerência, e de novo coerência. Desde o começo, inculquem em si mesmos o hábito da coerência estrita na aquisição do conhecimento. Aprendam o ABC da ciência antes de tentar escalar seus picos. Nunca embarquem no que vem depois sem ter dominado o que vem antes. Nunca tentem ocultar as lacunas de seu conhecimento, mesmo pelas especulações e hipóteses mais audaciosas. Não importa quanto esta bolha de ilusão possa deleitar os olhos pela profusão de cores, ela com certeza explodirá, e a vocês não restará nada além de confusão. Desenvolvam em si mesmos a contenção e a paciência. Nunca evitem as tarefas árduas da ciência. Estudem, comparem, acumulem fatos. Não importa quão perfeita a asa de um pássaro possa parecer, ela nunca poderia fazer o pássaro voar sem o suporte do ar. Os fatos são o ar dos cientistas. Sem eles vocês nunca serão capazes de alçar vôo, sem eles suas “teorias” serão estéreis. Mas ao estudar, experimentar e observar façam o possível para chegarem embaixo da pele dos fatos. Não se tornem armazenadores de fatos. Tentem penetrar nos segredos de sua origem. Busquem persistentemente as regras que os governam.

A segunda coisa é a modéstia. Nunca pensem que vocês sabem tudo. Não importa quão alto seja seu conceito, tenham sempre a coragem de dizer a si mesmos: “Eu sou ignorante”. Não deixem que o orgulho os possua. Ele resultará em obstinação, quando vocês deveriam ser conciliatórios. Ele os levará a recusar conselho útil e ajuda amigável. Ele os privará da habilidade de serem objetivos. Na equipe na qual eu sou líder, tudo depende do ambiente. Todos nós estamos subordinados a uma causa comum e cada um faz sua parte. Conosco é quase impossível discernir o que é “meu” e o que é “seu”, mas desse modo, nosso objetivo comum apenas ganha.

A terceira coisa é – paixão. Lembrem-se, a ciência exige toda a sua vida. Mesmo que vocês tivessem duas vidas para dar, elas não seriam suficientes. A ciência exige do homem o máximo esforço e a suprema paixão. Sejam apaixonados em seu trabalho e em suas pesquisas.

Fonte: Extraído de Koshtoyants (1955, pp. 52-53).

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha mãe, **Silvia** e, minha irmã **Carol** por serem meu apoio e minha referência, e pelo amor incondicional que me fez ter fé e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela minha vida.

A Prof^a. Dra. **Azair Liane Matos do Canto de Souza**, pela oportunidade e orientação científica que me fez crescer tanto cientificamente como pessoalmente.

Ao meu “co-orientador” e amigo **Gabriel Fachini** pela orientação e amizade.

À **banca de qualificação**, Profa. Dra. Débora, Profa. Dra. Rosana e Prof. Dr. Carlos, pelas sugestões.

À **banca de defesa**, Profa. Carla e Prof. Carlos, pela atenção prestada na leitura e sugestões deste trabalho.

À minha **mãe** e minha **irmã** pelo amor, paciência desde sempre e por serem meu alicerce.

Ao meu avô **J.C. de Oliveira** (*in memoriam*) e meu tio **Nenê** que me proporcionaram o início da minha vida acadêmica.

Aos meus tios e tias, **Neguinho, Rejane, Jacú, Marianne, Fefeu e Margareth**, por serem parte desta conquista.

Ao meu namorado **Richard D. Leite** por todo amor, amizade, companheirismo e paciência que me mantiveram calma e firme desde o resultado da seleção até sempre.

Aos meus sogros, **Glória e José Antônio**, e meu cunhado **Douglas** pelo acolhimento em sua família.

À minha amiga e “irmã-acadêmica”, **Barbara**, pela amizade, trabalho e sociedade na nossa vida acadêmica.

Às minhas melhores amigas **Denise, Cypri, Flavinha, Marila, Claudia e Aline** e, pela amizade e incentivo.

Aos meus queridos compadres e amigos **Clariana e Guilherme Speretta**.

À técnica do laboratório de psicologia de aprendizagem (LPA), **Adriana Corsi**, pela ajuda no dia-a-dia.

Aos amigos e colegas do LPA, **Vinícius, Ila, Daniela, Cilene, Vanessa, Bruno Cortegoso, Bruno Diehl, Gabriel Bombarda, Letícia, Luana, Hέλvia, Fernando, Cacilda, Marjorie e Luciana** pela agradável convivência.

Aos amigos do **laboratório de farmacologia-UNESP**, pelo apoio sempre que necessário.

Ao **Alexandre** pela competência profissional na secretaria do Programa Interinstitucional da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao **Programa Interinstitucional da Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** UFSCar/UNESP.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela disponibilização da bolsa.

RESUMO

Diante de estímulos que representam perigo os animais manifestam reações de defesa que originam o medo e a ansiedade. Estes estímulos ativam o sistema serotoninérgico, o qual emite projeções para estruturas envolvidas nos mecanismos de defesa tais como, septo, hipotálamo, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal e amígdala, modulando as alterações comportamentais que podem ser caracterizadas como ansiedade. Estudos têm demonstrado que os receptores 5-HT₃ fazem parte desta modulação. O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo animal amplamente utilizado para avaliar a atividade ansiolítica de drogas. Atualmente, sabe-se que o reteste em roedores (ratos e camundongos) aumenta a evitação do mesmo, fenômeno este, que se refere à “tolerância de uma exposição” (OTT, do inglês *One Trial Tolerance*). A amígdala é uma das estruturas prosencefálicas que apresentam quantidade relevante de serotonina (5-HT), dessa forma, resultados recentes do nosso laboratório demonstram que microinjeções de ondansetron, antagonista dos receptores 5-HT₃, na amígdala de camundongos, produziu efeito ansiolítico avaliado no LCE. O objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores 5-HT₃ na amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Medidas convencionais de ansiedade (% de entrada e de tempo gasto nos braços abertos), atividade locomotora (frequência de entrada nos braços fechados) e medidas etológicas relacionadas à avaliação de risco foram registradas. O presente estudo demonstrou que a injeção intra-amígdala de ondansetron, antagonista de receptores 5-HT₃, produziu efeito ansiolítico tanto em camundongos ingênuos quanto em camundongos reexpostos ao LCE. A injeção de ondansetron em apenas uma das exposições produziu efeito ansiolítico, o que nos leva a concluir que a droga não produziu alteração da memória. Tanto na exposição 1 como na reexposição, nenhum dos tratamentos afetou a atividade locomotora. Portanto, embora a amígdala esteja envolvida na neurobiologia das reações de defesa, tais como a resposta de ansiedade, no que se refere ao fenômeno OTT ela parece não participar.

Palavras-chave: serotonina, amígdala, ondansetron, labirinto em cruz elevado (LCE) e OTT.

ABSTRACT

Against of stimuli that are dangerous, animals manifest defense reactions that cause fear and anxiety. These stimuli activate the serotonergic system, which sends projections to structures involved in defense mechanisms such as the septum, hypothalamus, hippocampus, amygdala and periaqueductal gray modulates the behavioral changes that can be characterized as anxiety. Studies have shown that 5-HT₃ receptors are part of this modulation. The elevated plus maze (EPM) is a widely used animal model to evaluate the anxiolytic activity of drugs. Currently, it is known that the retest in rodents (rats and mice) increases the avoidance of it, this phenomenon, which refers to "a display of tolerance" (OTT, One Trial Tolerance). The amygdala is a prosencephalic structures that have significant amount of serotonin (5-HT) in this way, recent results from our laboratory have shown that microinjections of ondansetron antagonist 5-HT₃ receptors in the amygdala of mice produced anxiolytic-like effect evaluated in LCE. The aim of this study was to evaluate the involvement of receptors 5-HT₃ receptors in the amygdala of mice prior experience the elevated plus-maze (EPM). Conventional measures of anxiety (% of entry and time spent in open arms), locomotor activity (frequency in closed arms) and ethological measures related to risk assessment were recorded. The present study demonstrated that intra-amygdala of ondansetron, antagonist of 5-HT₃ receptors, produced anxiolytic-like effects in naive mice and mice prior experience the LCE. The injection of ondansetron in only one of the exhibits produced anxiolytic-like effect, which leads us to conclude that the drug produced no change in memory. Both the Trial 1 and in Trial 2, none treatments affected locomotor activity. So while the amygdala is involved in the neurobiology of the defense reactions such as anxiety response, as it refers to the phenomenon it seems OTT not to participate.

Keywords: serotonin, amygdala, ondansetron, elevated plus-maze (EPM), OTT.

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. História da Neurobiologia do Medo e da Ansiedade.....	15
1.2. Ansiedade e medo.....	18
1.3. Neurobiologia das reações de defesa.....	20
1.4. Amígdala.....	24
1.5. Sistema Serotoninérgico e Sistema Nervoso Central.....	27
1.6. Modelo Labirinto em Cruz Elevado.....	31
1.7. “Tolerância de uma exposição”.....	34
2. Objetivo	
2.1. Geral.....	38
2.2. Específico.....	38
3. Material e Método	39
3.1. Ética.....	39
3.2. Sujeitos.....	39
3.3. Drogas.....	40
3.4. Cirurgia e Microinjeção das Drogas.....	40
3.5. Aparato e Procedimento Geral.....	42
3.6. Análise Comportamental.....	43
3.7. Histologia.....	45
3.8. Análise Estatística	46
4. Resultados	47
4.1. Efeito ansiolítico do ondansetron microinjetado na amígdala de camundongos avaliados durante a exposição 1 e reexposição ao LCE.....	48
5. Discussão	55
6. Conclusão	61
7. Referências	62
8. Apêndice	74

Lista de figuras e fotos

Figura 1. Circuito de Papez – Adaptado LeDoux, 1988.

Figura 2. Sistema Cerebral Aversivo (modificado de Graeff e Guimarães, 1999).

Figura 3. Sistema de Inibição Comportamental (adaptado de Brandão et al, 2003).

Figura 4. Estrutura pentamérica do receptor ionotrópico de serotonina do tipo 3 (Faerber et al, 2007).

Figura 5. Representação esquemática dos sítios de microinfusão na amígdala de camundongos. A marcação em cinza nas figuras representa os sítios de injeção (Atlas de Franklin e Paxinos (1997).

Figura 6. Efeito das microinfusões na amígdala de ondansetron (0,3 nmol/0,1µl) sobre a frequência de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, durante a exposição 1 e reexposição no LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) (n= 9-10).

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo veículo.

$p < 0,05$ comparado à exposição 1.

Foto 1. Labirinto em cruz elevado – LCE (aparato utilizado no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem – LPA).

Foto 2. Medidas etológicas de camundongos durante a exposição ao LCE. (A) levantamento protegido; (B) mergulho protegido; (C) postura de esticar o corpo na área protegida; (D) imobilidade desprotegida (fotos copiadas de Reis e Canto-de-Souza, 2008).

Lista de tabela

Tabela 1. Efeito das injeções de ondansetron (0,3 nmol/0,1 μ l) na amígdala de camundongos avaliados na Exposição 1 e Reexposição no LCE. Os valores representam as médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) dos outros comportamentos avaliados no LCE durante a exposição 1 e a reexposição (n= 9-10).

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo veículo (ANOVA seguido Duncan).

Lista de abreviaturas e símbolos

ANOVA – análise de variância

BLA – núcleo basolateral da amígdala

5-HT – 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT₃ – receptores de serotonina subtipo 3

BAs – braços abertos

BFs – braços fechados

EPM – erro padrão da média

i.p. – intraperitoneal

LCE – labirinto em cruz elevado

MeA – núcleo medial da amígdala

TMERG – total de mergulhos

n – número de sujeitos

NDR – núcleo dorsal da rafe

NMR – núcleo mediano da rafe

OND – ondansetron (GR38032)

PE – polietileno

SAP – stretched attend posture (postura de esticar o corpo)

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SNC – sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

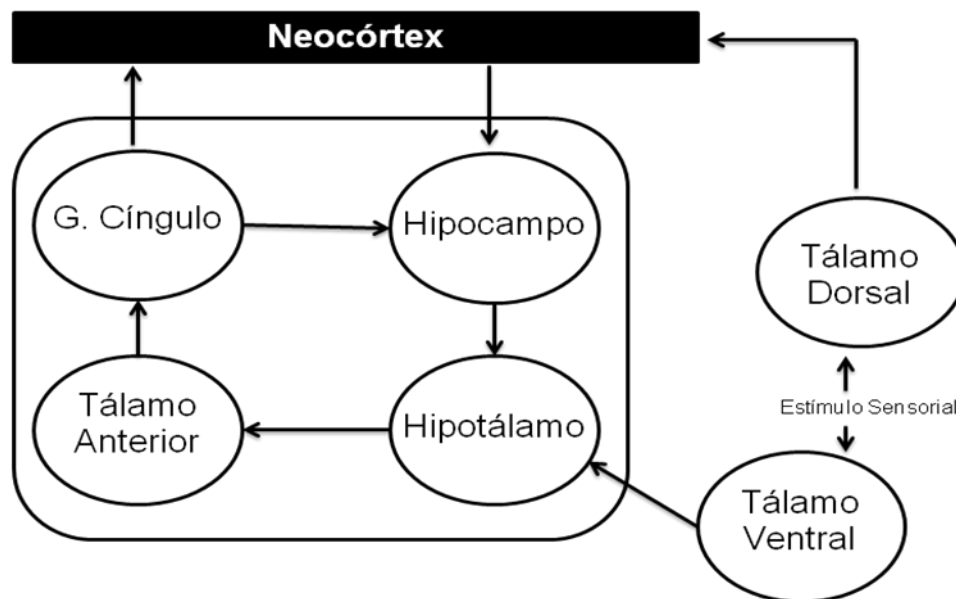
1.1. História da Neurobiologia do Medo e da Ansiedade

Do ponto de vista histórico, segundo Dalgleish (2004), o estudo da neurociência afetiva se inicia com os relatos de Charles Darwin publicados originalmente em 1872 sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional do homem, no livro *“The expression of the emotions in man and animals”* onde seus trabalhos indicaram que, através de estudo do comportamento de outros animais era possível a compreensão das emoções no homem; e em 1884, com James no artigo intitulado *“What is an emotion?”*.

Com a teoria de James-Lang em 1885, postulou-se a “Teoria das Emoções” na qual as respostas fisiológicas provem da base de experiências emocionais (Cannon, 1927). E assim, no início do século XX, os trabalhos de Bard (1928) e Hess e Brugger (1943) sugeriram que a expressão da emoção estava sob controle de circuitos neurais, com foco no hipotálamo como sitio crucial da expressão da emoção e comportamentos defensivos (Hess e Brugger 1943). Bard em 1928 identificou então a metade caudal do hipotálamo como sitio crítico modulando “Sham Rage” através de lesões cerebrais em gatos.

Estes estudos levaram Cannon e Bard a propor a teoria hipotalâmica da emoção, na qual Papez, em 1937, estendeu incluindo estruturas prosencefálicas, como hipotálamo, núcleo talâmico anterior, giro do cíngulo, hipocampo e suas interconexões, formando assim, um sistema harmônico que elaboraria as funções e a expressão das emoções (Figura 1). Papez via ainda

o giro do cíngulo como a área cortical responsável pela experiência emocional, e que poderia ser ativada tanto pelo neocórtex quanto por estruturas inferiores, como o hipotálamo. O esquema do circuito neural da emoção propõe que entradas sensoriais pelo tálamo divergindo em fluxos do pensamento e da sensação.



Circuito de Papez (Adaptado LeDoux, 1988)

Figura 1. Circuito de Papez – Adaptado LeDoux, 1988.

Ainda em 1937, a síndrome Kluver-Bucy foi descrita após a remoção cirúrgica bilateral dos lobos temporais em macacos produzindo a perda da reatividade emocional, o aumento comportamento exploratório, a tendência a examinar objetos com a boca, hipersexualidade e mudanças anormais na dieta como, por exemplo, a coprafagia (comer as fezes) (Kluver e Bucy, 1937). O “Circuito de Papez” foi então redefinido por Paul MacLean em 1949, como “*Sistema Límbico*”, onde incluiu o septo e amígdala.

Em 1956, Hunsperger confirmou e estendeu estes achados mostrando que a estimulação elétrica ao longo de uma via incluindo a amígdala, núcleo da

estria terminal (BNST), área hipotalâmica lateral e substância cinzenta periaquedutal (SCP), produziu comportamento defensivo (Hunsperger, 1956). Mais recentemente, estudos com lesões e uso da expressão da ativação da proteína FOS como marcador da ativação neural tem direta implicação em várias estruturas prosencefálicas, mesencefálicas e rombencéfalo, incluindo a amígdala, BNST, córtex prefrontal, hipocampo, rafe dorsal, septo, hipotálamo e SCP, no comportamento defensivo (Blanchard e Blanchard, 1972; Blanchard et al., 1981; Bovier et al., 1982; Canteras, 2002; Degroot & Treit, 2004; Graeff, 1994; Pentkowski et al., 2006).

Em 1962 Schachter & Singer descreveram experimentos indicando a importância de fatores cognitivos na determinação da natureza das experiências emocionais e 20 anos mais tarde Gray publicou "*The Neuropsychology of Anxiety*" (Gray, 1982).

Estudos realizados em 1986 por LeDoux propuseram múltiplos caminhos da amígdala para medo condicionado e afirmam ainda que lesões do hipocampo em animais provocariam intensas reações do tipo emocional e que tumores da região do cíngulo levavam a apatia, defeitos de memória e estupor. Já lesões em corpos mamilares levavam a uma aparente inatividade das respostas emocionais, enquanto que lesões do tálamo anterior produziam choro e riso espontâneo (Blanchard e Blanchard, 1972; Blanchard et al., 1981; Bovier et al., 1982; Canteras, 2002; Degroot e Treit, 2004; Graeff, 1994; Pentkowski et al., 2006; Canteras e Goto, 1999).

Damasio *et al.* (2000) publicou evidências que diferentes regiões do cérebro são subjacentes a diferentes emoções. Por sua vez Canteras (2002; 2008) propôs o envolvimento da zona defensiva hipotalâmica medial como

importante estação para transmissão, na qual conduz a expressão do comportamento defensivo incondicionado causado por um estímulo psicológico.

Ainda, há muitos estudos realizados em vários laboratórios que buscam através de técnicas comportamentais e moleculares o entendimento da neurobiologia das reações de defesa.

1.2. Ansiedade e medo

Quando um animal é confrontado com uma ameaça à sua integridade física ou à própria sobrevivência, seja esta representada por um predador ou um agressor da mesma espécie, seja por uma simples mudança no ambiente (estímulo) que o advirta da ocorrência de dano iminente, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Em circunstâncias onde o perigo não é tão evidente, porém vago e persistente, ou os sinais de advertência que provocam o medo não são conscientemente percebidos, denomina-se estado de apreensão, que então se verifica, de ansiedade (Graeff, 1998).

A ansiedade e o medo são respostas emocionais de grande valor adaptativo. Funcionam como impulso motivacional fundamental em diversas formas de comportamento e, assim, advertem sobre perigos e ameaças à integridade da pessoa, estimulando o organismo a tomar medidas necessárias para impedi-los (Gray e McNaughton, 2000; Blanchard et al, 2001; Brandão, 2001).

Diante de estímulos que representam perigo há origem do medo e da ansiedade e, assim, os animais manifestam reações de defesa. Portanto, tais emoções são muito semelhantes, diferindo-se no fato de que, enquanto o medo é uma resposta a situações claras e evidentes de perigo previsível e externo, a ansiedade é uma resposta a um perigo potencial, vago, obscuro e não previsível (Blanchard et al, 1990; Graeff, 1998).

McNaughton e Corr (2004) sugeriram a existência de dois sistemas de defesa, o que modula as ameaças potenciais e o conflito aproximação-esquiva (relacionado à ansiedade), amplamente representado no prosencéfalo e, o sistema de defesa de fuga que comanda a retirada da ameaça distal (relacionados ao medo) e do perigo proximal (relacionado ao pânico), representado no rombencéfalo. Os dois sistemas são longitudinalmente distribuídos ao longo do cérebro.

A distinção básica entre ansiedade e medo é, que o medo tem a função de mover o animal para longe do perigo envolvendo comportamentos de fuga, luta e imobilidade, além de ser insensível a drogas ansiolíticas. Já a ansiedade envolve o conflito aproximação-esquiva com a função de mover o animal para o perigo e assim, aumenta a avaliação de risco, uma vez que, é sensível aos ansiolíticos (McNaughton e Corr, 2004).

As alterações psicofisiológicas que compõem a ansiedade, tais como, aceleração da respiração e dos batimentos cardíacos e sensação de ameaça, também são bastante semelhantes às do medo, podendo admitir-se uma identidade básica dos mecanismos neurais integrando ambos os estados emocionais (Graeff, 1998).

A ansiedade é um mecanismo universal para gerar um comportamento adaptativo, ou seja, orientar respostas adequadas ao ambiente onde existe perigo ou ameaça. Porém em humanos, o nível elevado de ansiedade predispõe aos indivíduos o aparecimento de transtornos psiquiátricos tais como, fobias, depressão e estresse pós-traumático (Yamasue et al, 2008).

Sob uma perspectiva evolutiva, a investigação dos comportamentos defensivos em mamíferos, como nos roedores, por exemplo, é de extrema relevância para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos transtornos de ansiedade, já que estes são considerados patologias do sistema de defesa humano (Gray e McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2001; Graeff e Zangrossi, 2002).

Em um ambiente novo, potencialmente perigoso, ou quando o animal pressente uma ameaça, porém não avaliou todas as conseqüências, fica imóvel e quieto, com a musculatura tensa, bem como vigilante e de prontidão para ação rápida e vigorosa. Esta reação de defesa é denominada *congelamento*. Alternando com a imobilidade, o animal pode realizar exploração cautelosa do ambiente, fazendo assim *avaliação de risco*. Portanto, uma vez definido o perigo, o animal recorre à fuga da situação ameaçadora ou alternativamente, luta contra o agressor (Graeff, 1998).

1.3. Neurobiologia das reações de defesa

O estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade teve início a partir de relatos de Charles Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem. Seus trabalhos, publicados originalmente em 1872 no

livro "*The Expression of Emotions in Man and Animals*", indicavam que o estudo do comportamento dos animais era a chave para a compreensão das emoções no homem (Rodgers et al., 1997a; Brandão et al., 2003). A partir desta abordagem, o homem, tendo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes além de semelhanças físicas, suas emoções básicas.

Neste contexto, as raízes do medo e da ansiedade estão nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam ameaça à sobrevivência, ou à sua integridade física. São várias as fontes de perigo tais como, estímulos ambientais (altura, claridade), alterações nos padrões físico-temporais (tempestades, incêndios, exposição a novos ambientes), estímulos nociceptivos (choques elétricos) ou mesmo por ataques de animais da mesma espécie. A apresentação da resposta dependerá da situação confrontada, da espécie em questão, resultando em respostas diferentes para estímulos distintos (Zangrossi e Graeff, 2004). Em geral, os animais utilizam uma de quatro estratégias defensivas básicas: fuga, congelamento, ataque defensivo ou submissão (Adams, 1979; Blanchard e Blanchard, 1988). A escolha por determinada estratégia leva em conta fatores como características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou com o ambiente.

Embora a ansiedade e o medo possuam origens nas reações de defesa quando na presença de situações que envolvam perigo, acredita-se que haja diferença entre essas duas condições. Segundo Brandão et al. (2003), estímulos condicionados de medo potenciais e distais eliciam respostas de medo no sistema neural, constituído pelo núcleo mediano da rafe, septo,

hipocampo e substância cinzenta periaquedutal ventral. Por outro lado, estímulos ameaçadores proximais ou intensos eliciam respostas incondicionadas de medo geradas no teto mesencefálico. O hipotálamo parece funcionar como um relê na geração e elaboração destas respostas, com seus componentes motores, autonômico e endócrino (através de suas conexões com a hipófise). Assim, a amígdala funciona como uma *interface* importante entre estes dois sistemas e a ativação de um ou outro destes circuitos neurais resulta na experiência emocional que alguns autores têm denominado condições como medo, ansiedade ou pânico (Brandão et al, 1994; Brandão et al, 1999; Nunes-de-Souza et al, 2000; Carobrez e Bertoglio, 2005).

Além disso, alguns autores sugerem que a distinção entre medo e ansiedade residiria exatamente nas estratégias comportamentais adotadas pelos animais. Assim, quando o estímulo é potencialmente ameaçador, este desencadearia comportamentos de avaliação de risco (posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça), caracterizando um estado de ansiedade. Quando o estímulo ou situação ameaçadora é real, os comportamentos apresentados de luta, fuga ou congelamento caracterizariam medo. Outra diferença entre esses dois estados está no fato do medo ser insensível ao tratamento com drogas ansiolíticas, já a ansiedade se mostra sensível à ação dessas drogas (Blanchard et al., 1993). Dessa forma, modelos animais de medo e ansiedade favoreceriam a expressão de comportamentos defensivos frente a situações artificiais ou naturais de perigo, permitindo a compreensão de suas bases neurobiológicas subjacentes (Blanchard et al., 1993).

Evidências obtidas em laboratório a respeito das bases neurais do

comportamento emocional apontam para existência de circuitos neurais específicos que respondem de acordo com o estímulo ao qual o indivíduo é exposto. O *Sistema Cerebral Aversivo* (Figura 2), representado pelo hipotálamo medial, pela substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e pela amígdala, está associado à emissão de respostas incondicionadas (inatas e não aprendidas). Neste sistema a amígdala é a responsável pela avaliação do tipo e grau do perigo, e o resultado desta avaliação seria transmitido para o hipotálamo medial e SCP. Esta última teria a função de selecionar e organizar as respostas comportamentais e fisiológicas de defesa mais apropriadas. O hipotálamo medial por sua vez, regula o funcionamento da hipófise, responsável pela secreção de alguns hormônios (Hetem e Graeff, 2004).

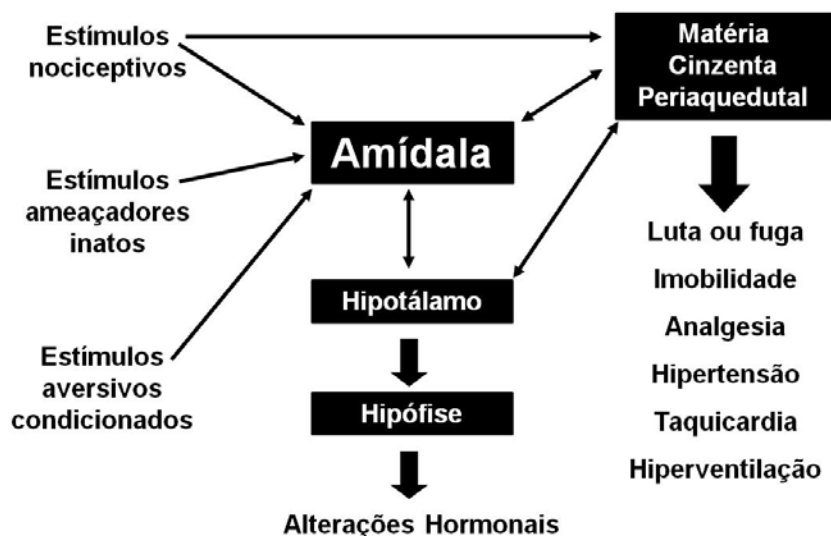


Figura 2. Sistema Cerebral Aversivo (modificado de Graeff e Guimarães, 1999).

A estimulação elétrica de estruturas que compõem este sistema produz um padrão típico de respostas caracterizado por intensa atividade motora (acompanhada de saltos) e alterações autonômicas como elevação da pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, piloereção, micção,

defecação, exoftalmia (para revisão, Brandão et al., 1994; 1999).

A organização das respostas condicionadas, por sua vez, é realizada pelo *Sistema de Inibição Comportamental* (Figura 3), representado pelo sistema septo-hipocampal, núcleo mediano da rafe e substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPv) (Gray e McNaughton, 2000). A ativação deste sistema por sinais de punição, frustração, perigo ou situações novas resulta em inibição de qualquer comportamento que o animal esteja realizando, bem como, aumento do nível de vigilância e atenção ou preparo para ação física rigorosa (Hetem e Graeff, 2004). Sabe-se que a amígdala está envolvida na ativação dos dois sistemas, agindo como *interface* entre o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral aversivo (Brandão et al., 2003).



Figura 3. Sistema de Inibição Comportamental (adaptado Brandão et al, 2003).

1.4. Amígdala

A amígdala ou corpo amidalóide, identificada por Budach, no início do século IX (para revisão, Sah et al, 2003), é uma estrutura em forma de

amêndoa, localizada dentro da região ântero-inferior do lobo temporal do hemisfério cerebral e constitui uma massa esferóide de substância cinzenta, apresentando cerca de 2 cm de diâmetro. Esta região do cérebro faz parte do sistema límbico e é um importante centro regulador do comportamento sexual e da agressividade (LeDoux, 1986; 1998; 2007).

A amídala tem comunicação com diversas estruturas do sistema límbico e atua fazendo uma *interface* entre aspectos cognitivos e afetivos da ansiedade. Esta pequena estrutura se interconecta com o hipocampo, os núcleos septais, a área pré-frontal e o núcleo dorso-medial do tálamo. Essas conexões garantem seu importante desempenho na mediação e controle das atividades emocionais de ordem maior, como amizade, amor e afeição, nas exteriorizações do humor e, principalmente, nos estados de medo e ira e na agressividade. A amídala é fundamental para a auto-preservação, por ser o centro identificador do perigo, gerando medo e ansiedade e colocando o animal em situação de alerta, aprontando-se para fugir ou lutar (LeDoux, 1992; 1998).

Inicialmente, ela foi descrita como um grupo de células que atualmente é denominado complexo basolateral. Por conseguinte, um grande número de estruturas que circundam o complexo basolateral vem sendo identificado em muitas espécies e forma o que se conhece atualmente como complexo amidalóide (Sah et al., 2003).

O complexo amidalóide compreende 13 núcleos, com amplas conexões internucleares e intranucleares. Estes núcleos e subnúcleos são classificados com base na organização citoarquitetônica, histoquímica e conexões realizadas (Pare, 2004; LeDoux, 2007). Os núcleos da amídala são divididos em três

grupos: 1) o *grupo profundo ou basolateral*, que abrange o núcleo lateral, núcleo basal e núcleo lateral secundário; 2) o *grupo superficial ou cortical*, que contém os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; 3) o *grupo centromedial*, composto dos núcleos medial e central. Além disso, há um grupo de núcleos separados que não pode ser classificado em um desses três grupos e que envolve as massas celulares intercaladas e a área amídalohipocampal (Pare et al, 2004).

Dentro deste contexto, postula-se que a amígdala funcione como *interface* entre os sistemas sensoriais, que conduzem a informação sobre os estímulos condicionados e incondicionados até seus núcleos, lateral e basolateral, e as regiões subcorticais, que controlam a expressão das respostas condicionadas motoras e autonômicas (LeDoux, 1992; 1998).

A amígdala é relativamente uma área silenciosa do encéfalo e contém forte rede inibitória que mantém atividade celular baixa. Conhecida também, por estar envolvida na regulação do comportamento emocional, acredita-se que ela pode ser um importante sítio para a ação dos benzodiazepínicos (LeDoux, 2007). Ela está relacionada à ansiedade condicionada, e sua estimulação elicia medo/ansiedade (Nieminem et al., 1992), enquanto que lesões em sua estrutura reduzem comportamentos relacionados à ansiedade (Treit et al., 1993).

Além disso, esta estrutura está envolvida nos principais circuitos serotoninérgicos que regulam as emoções, uma vez que ela é um dos principais sítios pós-sinápticos que recebe projeções serotoninérgicas provenientes do núcleo dorsal da rafe (Deakin e Graeff, 1991; Hoyer e Martin, 1997) e que apresenta em sua estrutura, receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃,

onde os do tipo 5-HT_{1A} localizam-se principalmente na porção central, enquanto que os receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ estão predominantemente localizados na porção basolateral desta estrutura (Rainnie, 1999).

A administração de antagonistas tais como, ondansetron e tropisetron na amígdala, produziu efeito ansiolítico em ratos avaliados tanto no teste de interação social (Higgins et al., 1991) como no labirinto em cruz elevado (Tomkins et al., 1990). Além disso, outros antagonistas dos receptores 5-HT₃, tais como GR 38032F, MDL 72222, GR65630 e zacopride, quando administrados nos núcleos da rafe dorsal e mediano e na amígdala de ratos e camundongos promoveram efeitos ansiolíticos nos testes claro/escuro, interação social e LCE (Costall et al., 1989; Tomkins et al., 1990; Higgins et al., 1991). Estes resultados sugerem que a amígdala está envolvida nos efeitos dos antagonistas de receptores 5-HT₃ (Higgins et al., 1991).

Neste sentido, foi demonstrado que microinjeções de ondansetron, antagonista dos receptores 5-HT₃, na amígdala de camundongos, produziu efeito ansiolítico avaliado no LCE (Marucci e Canto-de-Souza, 2006; Laine et al., 2008).

1.5. Sistema Serotoninérgico e Sistema Nervoso Central

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor envolvido não só na ansiedade, mas também em outros distúrbios, tais como, depressão, fobias e pânico, e produz tanto efeitos ansiolíticos, como ansiogênicos, em diferentes modelos, e com drogas seletivas sob diferentes tipos de receptores (Graeff, 1998).

Deakin e Graeff (1991) sugeriram uma via ascendente de 5-HT que se origina do núcleo dorsal da rafe, inerva a amígdala e o córtex frontal, propiciando o medo e a ansiedade condicionada. Outra via sai do núcleo dorsal da rafe periventricular, inerva a matéria cinzenta periaquedutal e periventricular, inibindo reações de luta/fuga a um perigo iminente. Assim, estes autores consideraram um papel dual da 5-HT na mediação dos diferentes tipos de ansiedade. Isto porque enquanto a 5-HT liberada nos neurônios terminais do núcleo dorsal da rafe aumenta a ansiedade condicionada na amígdala, a 5-HT liberada do núcleo dorsal de rafe inibe o medo condicionado na matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

A neurotransmissão serotoninérgica é bastante complexa, uma vez que existem sete famílias de receptores da serotonina, 5-HT₁₋₇, num total de 14 diferentes subtipos de receptores 5-HT em mamíferos (para revisão, Faerber et al, 2007; Hannon e Hoyer, 2008). Dentre esses, os que estão mais diretamente envolvidos na ansiedade são os receptores 5-HT_{1A} (Canto-de-Souza et al, 2002; Nunes-de-Souza et al, 2002), 5-HT₂ (Nunes-de-Souza et al, 2008), e 5-HT₃ (Marucci e Canto-de-Souza 2006; Laine et al, 2008).

Os receptores podem então, serem divididos em metabotrópicos (acoplados a proteína G) ou ionotrópicos. Todos os receptores de serotonina, exceto o do tipo 3, são acoplados à proteína G, seja ela excitatória ou inibitória. Assim, o único receptor acoplado a canal iônico é o 5-HT₃. É um receptor da superfamília *cys-loop* similar aos receptores nicotínicos, glicínicos e GABAérgico (tipo A) (Hannon e Hoyer, 2008).

O receptor 5-HT₃ possui subunidades pentaméricas que formam um canal central cilindricamente permeável a pequenos cátions. Cinco

subunidades 5-HT_{3A-E} foram identificadas e que mostram diferenças no terminal-amina e na região transmembrana. Receptores funcionais homoméricos 5-HT_{3A} (ativação de proteína cinase A e C) e receptores heteroméricos 5-HT_{3A/B} são expressos neuronalmente. As subunidades 5-HT_{3B} e 5-HT_{3C} por si só não formam receptores completos e, recentemente, foram identificadas as subunidades -D e -E, ainda não caracterizadas quanto a sua funcionalidade (Figura 4) (Faerber et al, 2007; Barnes et al, 2009).

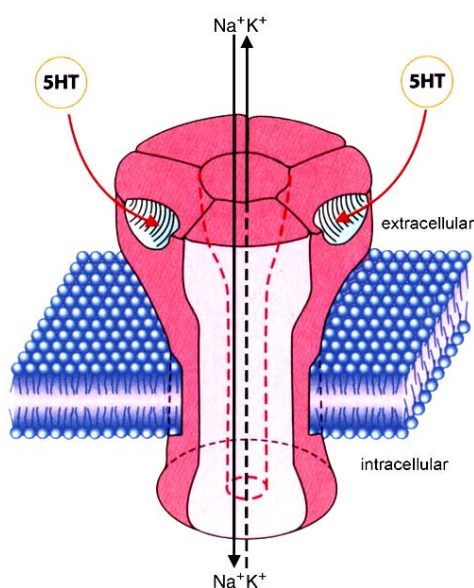


Figura 4. Estrutura pentamérica do receptor ionotrópico de serotonina do tipo 3 (Faerber et al, 2007).

Os receptores de serotonina do tipo 3 estão localizados na periferia em células mononucleares e células enterocromafins intestinais, além de neurônios autonômicos pós-ganglionares e neurônios do sistema sensorial e entérico (plexos mioentérico e submucosal). A alta densidade, embora em baixa presença quando comparada com outros tipos, destes receptores no sistema nervoso central é encontrada na área postrema, núcleo do trato solitário, núcleo dorsal do nervo vago, núcleo caudado, núcleo *accumbens*, amígdala, hipocampo, córtex entorrinal, córtex frontal, córtex cingulado e corno gânglio

dorsal, além de neurônios GABAérgicos (Hoyer et al., 1994; Faerber et al, 2007; Hannon e Hoyer, 2008).

Já é descrito na literatura a relação entre a função de receptores 5-HT₃ e comportamentos de ansiedade (Hensler et al., 2004), uma vez que antagonista seletivo de receptor 5-HT₃, o ondansetron (GR38032, Butler et al, 1988) forneceu as primeiras indicações de que estes receptores podiam modular processos de ansiedade (Higgins et al., 1991).

De fato, os receptores 5-HT₃ podem ter importante papel nos processos neuroquímicos envolvidos na ansiedade, pois baixas doses de ondansetron, granisetron, tropisetron e MDL72222 aumentaram a interação social em ratos sob condições aversivas (Jones et al., 1988; Costall et al., 1988). Além disso, altas doses de ondansetron e granisetron exibiram propriedades ansiogênicas (Costall et al., 1988).

Contudo, o ondansetron como dito anteriormente, é um antagonista dos receptores 5-HT₃ e foi introduzido na prática clínica como antiemético para tratamento de câncer, em circunstâncias profiláticas e terapêuticas. Porém, pesquisas em animais e humanos também refletiram a possibilidade da sua aplicação em tratamento como alcoolismo, dependência da cocaína, síndrome da abstinência de opióides, desordens da motilidade gastrointestinal, bem como transtornos de ansiedade (Ye et al, 2001).

Sendo assim, durante as duas últimas décadas tem sido recolocado o conceito de drogas que interferem em processos complexos do SNC, que mostram funções imunomodulatórias e que exibem propriedades farmacodinâmicas. De fato, muitas questões sobre os receptores 5-HT₃ e seus

ligantes estão abertas, o que deve concentrar pesquisas futuras para entendimento mais claro dos efeitos neuromodulatórios (Faerber et al, 2007).

1.6. Modelo Labirinto em Cruz Elevado

Modelos animais de ansiedade são utilizados na investigação pré-clínica para compreender a ação de novos fármacos com potencial terapêutico para os transtornos de ansiedade, bem como para investigar seu mecanismo de ação, ou ainda, para testar hipóteses sobre a fisiopatologia desses transtornos (Graeff e Zangrossi, 2002).

Dessa forma, em pesquisas sobre ansiedade e medo, é freqüente o uso de modelos animais, que são empregados como ferramentas para a seleção de potenciais agentes terapêuticos, fármacos que possam ser utilizados na clínica no tratamento deste distúrbio, bem como para simulações sobre a neurobiologia das emoções em geral (Rodgers e Cole, 1994; Griebel, 1995; Rodgers, 1997).

Os modelos podem ser divididos em duas categorias, modelos animais de ansiedade, incondicionado e condicionado. Estes últimos envolvem o treinamento dos animais, a privação de água/comida, o uso de choque elétrico. Os que não envolvem condicionamento são baseados em comportamentos espontâneos e são menos susceptíveis a fatores de interferência como aprendizado/memória, fome/sede ou mecanismos nociceptivos (Rodgers et al, 1997a).

Neste sentido, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos animais incondicionados mais utilizados para avaliar a atividade ansiolítica de

drogas. O teste foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e foi validado para ratos (Pellow et al., 1985) e para camundongos (Lister, 1987). Além disso, o modelo é baseado no conflito entre duas características inatas dos roedores, aversão por espaços abertos e tendência de exploração de novidade (Fernandes e File, 1996; Treit et al, 1993). Os principais índices de ansiedade no LCE são avaliados através de medidas espaços-temporais. O modelo tem-se mostrado, segundo Espejo (1997), bidirecionalmente sensível à manipulação na ansiedade, ou seja, o LCE é capaz de detectar tanto efeitos ansiolíticos (diminuição na ansiedade), como efeitos ansiogênicos (aumento na ansiedade).

Os principais índices de ansiedade avaliados no LCE compreendem medidas espaço-temporais de esquivas dos braços abertos, enquanto a atividade locomotora é avaliada seja pelo número total de entradas nos braços ou pelo número de entradas nos braços fechados (Lister, 1987; File, 1992). O número de entradas nos braços abertos do aparato (expresso como porcentagem do total de entradas em todos os braços abertos), e o tempo total gasto também nos braços abertos (expresso como porcentagem do tempo total gasto em todos os braços abertos) são os índices para se verificarem os níveis de ansiedade (Pellow et al., 1985). Também são utilizados como fonte de medida de ansiedade e de atividade locomotora, os comportamentos etológicos, como mergulhar, esticar, levantar, tempo de autolimpeza e de imobilidade (Rodgers e Johnson, 1995).

O modelo do labirinto em cruz elevado já detectou os efeitos ansiogênicos do FG-7142 (Lister, 1987), da cafeína (Lister, 1987), do pentilenotetrazol e do DMCM (Cruz et al., 1994; Barbalho et al., 2009), e os

efeitos ansiolíticos de compostos tais como o nitrazepam, o DN-2327 e o midazolam (Cruz et al., 1994; Rodger e Cole, 1992; Nunes-de-Souza et al., 2000; Reis e Canto-de-Souza, 2008), e outros benzodiazepínicos e barbitúricos em geral (Handley e Mithany, 1984; Pellow et al., 1985), tanto em ratos como em camundongos.

De fato, é interessante notar que os roedores continuam a indicar comportamentos de avaliação de risco, mesmo após pararem de evitar, por exemplo, uma área desprotegida, sugerindo que estas medidas podem mesmo ser mais sensíveis às drogas moduladoras da ansiedade, do que medidas de esquiva convencionais (Rodgers e Cole, 1994; Griebel et al., 1997, Rodgers, 1997). Assim, a função biológica da avaliação de risco é informar estratégias comportamentais em situações potencialmente perigosas (Blanchard et al., 1990 e Blanchard et al., 1993).

O comportamento defensivo nos mamíferos refere-se a toda ação que reduz as possibilidades de um animal ser prejudicado. As estratégias defensivas abrangem um amplo conjunto de manifestações comportamentais, incluindo as reações aos predadores, a determinadas situações e aos objetos inanimados (Rodgers e Dalvi, 1997).

Adaptações defensivas mais sutis, como por exemplo, avaliação de risco e o comportamento de esquiva, além de movimentos rápidos, imobilidade, piloereção e o comportamento defensivo e de ataque, podem ser evocados geralmente em resposta ao perigo proximal (Blanchard e Blanchard, 1993). Deste modo, Rodgers e Johnson (1995) sugeriram que sempre sejam analisados comportamentos que envolvam os parâmetros convencionais e etológicos, ao se utilizar o LCE para verificar a ansiedade.

1.7. “Tolerância de uma Exposição”

Um fator importante do LCE está relacionado à experiência antecedente ao labirinto que altera não somente o comportamento, mas também as respostas farmacológicas avaliadas em exposições subseqüentes, como por exemplo, os BDZs, que são significativamente reduzidos ou abolidos (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002; Reis e Canto-de-Souza, 2008).

Atualmente, sabe-se que o reteste em roedores (ratos e camundongos) aumenta a evitação do mesmo (Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002; Canto-de-Souza et al, 2002; Nunes-de-Souza et al, 2002; Reis e Canto-de-Souza, 2008), fenômeno este, que se refere à “tolerância de uma exposição” (OTT, do inglês *One Trial Tolerance*) (File et al, 1990).

Segundo File e Zangrossi (1993) a OTT poderia ser caracterizada por fobia específica ao labirinto em cruz elevado. Além disso, a habituação locomotora e memória/aprendizagem são algumas explicações para este fenômeno, visto que o aparato perde a característica novidade tão bem notada na primeira exposição (Fernandes e File, 1996; Canto-de-Souza et al, 2002; Nunes-de-Souza et al, 2002; Carobrez e Bertoglio, 2005; Serafim et al, 2010; Gianlorenço et al, 2010).

Entretanto alguns estudos ainda apresentam o envolvimento da alteração do estado dos sítios de ligação dos receptores BZD, bem como a mudança do estado emocional, sensibilidade ansiedade/medo e ativação de estruturas telencefálicas envolvidas no controle do medo aprendido (File et al,

1993; Dál-Col et al, 2003; Albrechet-Souza et al., 2008; Gomes e Nunes-de-Souza, 2009).

Neste sentido, de acordo com Espejo (1997), exposições repetidas à ambientes novos podem levar a habituação das respostas comportamentais, porém a falta de mudança do elemento tanto exploratório quanto locomotor, indica que a habituação pode não ocorrer.

Segundo Silva e Frussa-Filho (2000), existe uma importante ligação entre memória e ansiedade, de tal forma que alterações no nível ótimo emocional podem prejudicar tarefas que envolvem aprendizado e memória. Porém, estudos posteriores mostraram que a escopolamina, antagonista muscarínico conhecido por induzir déficit de memória, quando administrada previamente a primeira exposição ao LCE previne a perda do efeito ansiolítico do midazolam, agonista GABA_A, na reexposição de ratos ao aparato (Bertoglio e Carobrez, 2004).

O fenômeno “tolerância de uma exposição” pode representar ainda, a aquisição da resposta fóbica aos braços abertos durante a exposição 1, levando a atenuação ou perda do efeito ansiolítico dos BZD na reexposição (File, 1990; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002).

Outros autores, citados acima, também sugerem que a reexposição é caracterizada pelo surgimento de um fator de medo, avaliação de risco e ativação do córtex pré-frontal medial. Assim, propõem que a mudança do estado emocional por ativação de estruturas envolvidas com o medo aprendido, pode explicar a perda do efeito ansiolítico em exposições repetidas. Também mencionam que a amígdala funciona como *interface* entre padrões de ansiedade na exposição, e o controle cognitivo do medo presente na exposição

2. Desta forma, a sessão de reteste ao labirinto é proposta como uma ferramenta para avaliar a atividade cognitiva de roedores no controle do medo (Albrechet-Souza et al, 2008).

Portanto, a experiência anterior ao labirinto provoca nos roedores (ratos e camundongos), alteração no comportamento natural e espontâneo eliciado na subsequente exposição (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993). Este fenômeno, “tolerância de uma exposição”, é independente de fatores como, tratamento farmacológico na exposição inicial, material utilizado para a construção do labirinto (File et al,1993), período circadiano e condições de iluminação (Bertoglio e Carobrez, 2002).

Alguns autores mostraram que a substância cinzenta periaquedutal está envolvida na neurobiologia do fenômeno OTT, o que foi demonstrado pela injeção local de agonistas dos receptores GABA-BDZ e dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, respectivamente (Reis e Canto-de-Souza, 2008; Gomes e Nunes-de-Souza, 2009). Neste sentido, o estudo de Reis e Canto-de-Souza (2008), demonstrou que a injeção local de midazolam, agonista dos receptores GABA-BDZ, na SCP produziu diminuição da ansiedade na exposição 1 e ausência de efeito na reexposição de camundongos avaliados no LCE.

Porém, em estudo de Barbalho et al (2009) o efeito ansiolítico do midazolam, quando microinjetado na amígdala de camundongos na exposição 1, não sofre tolerância em animais reexpostos ao LCE.

Diante do exposto, os transtornos de ansiedade têm sido relacionados com anormalidades em processos cerebrais subjacentes às respostas ameaçadoras. O neurotransmissor serotonina parece desempenhar um papel significativo na modulação do comportamento defensivo. Portanto, tem sido

sugerido que a 5-HT, agindo sobre a amígdala, facilitaria o comportamento de avaliação de risco provocada por uma ameaça potencial, um comportamento relacionado à ansiedade (Del-Ben et al, 2008).

Conforme descrito acima, a mobilização dos receptores GABA-BZD da SCP sofre OTT, enquanto que a mobilização destes mesmos receptores na amígdala não sofre tolerância do efeito ansiolítico observado em camundongos (Reis e Canto-de-Souza, 2008; Gomes e Nunes-de-Souza, 2009). Entretanto, os resultados da literatura sobre este fenômeno OTT, envolvendo a modulação de receptores serotoninérgicos em estruturas límbicas, são controversos (Canto-de-Souza et al., 2002; Nunes-de-Souza et al., 2002; Gomes e Nunes-de-Souza, 2009).

Assim, como demonstrado anteriormente o ondansetron na amígdala de camundongos produziu efeito ansiolítico (Marucci e Canto-de-Souza 2006; Laine et al, 2008), *porém nenhum estudo ainda foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito deste antagonista dos receptores 5-HT₃, injetado na amígdala de camundongos e avaliados no fenômeno OTT.*

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Avaliar o envolvimento no fenômeno “tolerância de uma exposição” dos receptores 5-HT₃ da amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

2.2. Específico

Avaliar o efeito do antagonista do receptor 5-HT₃, administrado intra-amígdala, em camundongos ingênuos e reexpostos ao LCE.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Ética

Os experimentos realizados neste estudo estiveram de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) que é, por sua vez, baseada na US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Res. 041/2009).

3.2. Sujeitos

Foram utilizados camundongos da linhagem Suíço-albino, machos, selecionados de acordo com o peso de 25 a 30g, e fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), e mantidos no biotério do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem em condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), e luz (ciclo claro-escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 07h00) e livre acesso a alimento e água, exceto durante os breves períodos de teste.

3.3. Drogas

Ondansetron, antagonista seletivo dos receptores 5-HT₃, {cloridrato 1,2,3,9 - tetra - hidro - 9 metil 3[(2 metilimidazol) metil]}, PM:329,89g (Sigma), na dose (0,3 nmol/0,1µl) dissolvido em veículo (salina, 0,9% NaCl, com 2% de Tween 80). A droga utilizada foi baseada em estudos prévios (Fachini e Canto-de-Souza, 2006; Marucci e Canto-de-Souza, 2006; Laine et al, 2011 submetido).

A droga e o veículo foram codificados ao longo do procedimento de injeção para que o experimentador não tivesse conhecimento das mesmas. Os códigos só foram liberados após o registro e análise dos comportamentos observados nos DVDs de gravação.

3.4. Cirurgia e Microinjeção das Drogas

Os animais foram anestesiados com solução de xilazina e cloridrato de cetamina (100 mg/Kg e 10 mg/Kg, i.p., respectivamente) e submetidos à cirurgia estereotáxica para a implanção de duas cânulas-guia com largura de 25-gauge e 7mm de comprimento sob ângulo reto, de acordo com as coordenadas do Atlas de Franklin e Paxinos (1997): -0,8 ântero-posterior, $\pm 2,7$ lateral, e -2,0 ventral a superfície do crânio (Bregma). As cânulas foram fixadas com cimento acrílico auto-polimerizante (clássico JET) e seladas com mandris para evitar obstrução e servir de proteção das mesmas. Durante os quatro dias após a cirurgia, os animais receberam solução de paracetamol infantil na água

do bebedouro (concentração final 250/500mL de água) para minimizar a nocicepção pós-operatória nos animais (Messier et al, 1999).

A exposição 1 ocorreu no quarto dia após a recuperação da cirurgia e cada camundongo foi segurado gentilmente pelo experimentador, para remoção dos mandris. Em seguida, as agulhas de injeção (33-gauge e 9,0 mm) foram inseridas nas cânulas-guia para infusão de soluções na amígdala. As agulhas de injeção ultrapassavam 2 mm a ponta de cada cânula-guia. As agulhas foram conectadas aos tubos de polietileno (PE-10) e a duas seringas Hamilton de 10 µl. A bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar bilateralmente 0,1 de solução durante o período de 60 segundos com permanência das agulhas de injeção por mais 90 segundos para confirmar a injeção. O movimento de uma pequena bolha de ar nos tubos de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (Nunes-de-Souza et al, 2000).

Após a retirada das agulhas e recolocação dos mandris, os animais foram alojados individualmente em uma caixa-viveiro, por um período de 5 minutos. Em seguida, foram colocados na base central do labirinto, com a face voltada para um dos braços abertos. Os testes foram realizados durante 5 minutos e registrados em vídeo-câmera, para posteriormente serem analisados.

Após o período de teste o aparato foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool (20% v/v) e seco com papel toalha. Todo o teste do labirinto foi filmado por uma câmera (Panasonic - X12) posicionada com inclinação de aproximadamente 45°, e os resultados coletados analisados posteriormente por observação do DVD (LG DR-Z65) na televisão (Panasonic 14 polegadas).

Vinte e quatro horas após a primeira exposição foi realizada a reexposição (exposição 2). O mesmo procedimento de injeção foi realizado conforme descrito para a exposição 1.

3.5. Aparato e Procedimento Geral

Foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE) (Foto 1), um equipamento feito de madeira e vidro que consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0.25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos ortogonalmente a uma plataforma central (5 x 5 cm) elevada a uma altura de 38.5 cm do solo. Os braços abertos, a plataforma central e o piso dos braços fechados são feitos de madeira, enquanto que as paredes dos braços fechados são feitas de vidro transparente (modificado de Lister, 1987). A iluminação no assoalho da plataforma central foi de 77 lux. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (8:00 – 12:00h).

Após o período de recuperação, os camundongos foram transportados para a sala experimental onde permaneceram 30 minutos sem perturbação antes do teste. O experimento 1 consistiu em microinjeção bilateral de veículo (salina, 0,9% NaCl, com 2% de Tween 80) ou ondansetron (0,3 nmol/0,1µl). Os grupos formados neste experimento foram: veículo (exposição 1) e veículo (reexposição); veículo (exposição 1) e ondansetron (reexposição); ondansetron (exposição 1) e veículo (reexposição); ondansetron (exposição 1) e ondansetron (reexposição).

Depois das respectivas injeções centrais, previamente as exposições 1 e 2, os animais foram colocados individualmente sobre a plataforma central do LCE para avaliação comportamental por um período de 5 minutos cada.



Foto 1. Labirinto em cruz elevado – LCE (aparato utilizado no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem – LPA).

3.6. Análise comportamental

Os comportamentos foram avaliados pela análise dos DVDs gravados, por um observador treinado, usando o programa de análise etológica X-Plo-Rat (Garcia et al, 2005). Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (Lister, 1987) quanto os etológicos (Cruz et al, 1994; Rodgers et al, 1997a).

As medidas convencionais compreenderam as freqüências do total de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Estes dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de

permanência dos animais nos braços abertos [Entradas: (aberto/ total) x 100; Tempo (tempo no compartimento/300) x 100].

As medidas etológicas compreenderam a frequência e duração de levantamentos (elevação do corpo sobre as patas traseiras), mergulhar a cabeça (head-dipping - frequência de movimentos exploratórios da cabeça/ ombros em direção ao solo), posturas de esticar o corpo ([stretched attend postures - SAP] - frequência de esticar o corpo e retraí-lo à posição original, sem a ocorrência de locomoção) e imobilidade (ausência de atividade locomotora nos membros dianteiros/traseiros e corpo, exceto movimentação respiratória) (Foto 2).

Como os sinais de tigmotaxia são importantes para a exploração no LCE (Treit et al., 1993), os comportamentos de mergulhar a cabeça e esticar o corpo foram diferenciados quanto ao local de sua ocorrência no labirinto. Os braços fechados e a plataforma central são normalmente designados como áreas “protegidas” do labirinto e os dados coletados nestes compartimentos foram mostrados no total e como porcentagem ([protegido/ total] x 100) de cada comportamento.

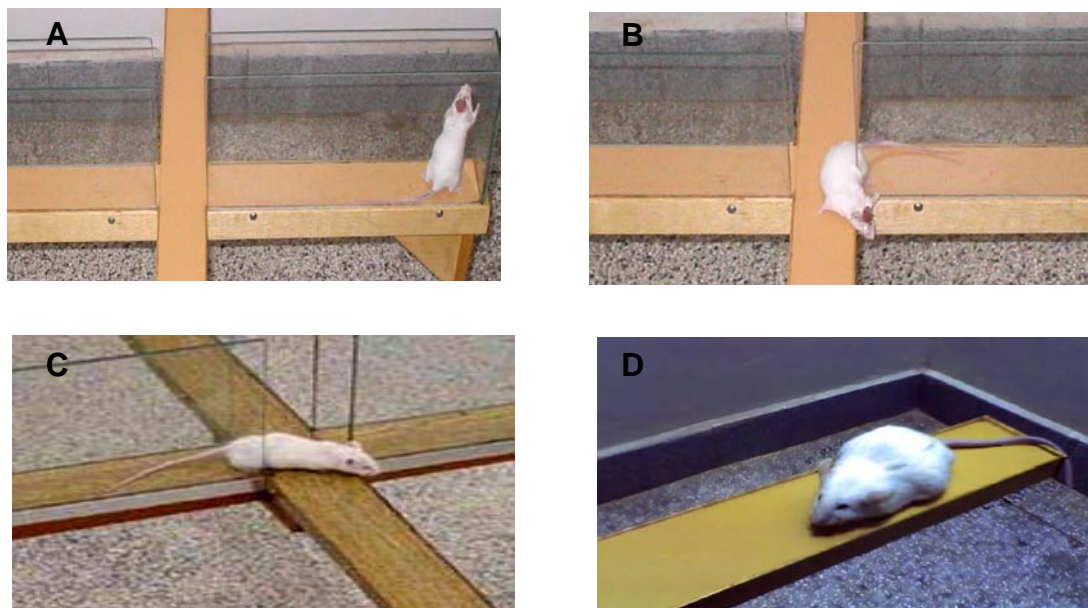


Foto 2. Medidas etológicas de camundongos durante a exposição ao LCE. (A) levantamento protegido; (B) mergulho protegido; (C) postura de esticar o corpo na área protegida; (D) imobilidade desprotegida (fotos copiadas de Reis e Canto-de-Souza, 2008).

3.7. Histologia

Ao final dos experimentos, todos os animais receberam microinjeção bilateral de azul de metileno ($0,1\mu\text{l}$) na amígdala, de acordo com o procedimento descrito acima para injeção de drogas. Os animais foram anestesiados com sobredose de xilazina e cetamina (200 mg/kg , i.p.), e decapitados, para a retirada dos seus encéfalos. Estes foram armazenados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente serem cortados em secções coronais de $70\text{ micrômetros } (\mu\text{m})$ ao longo do trajeto da cânula, com a utilização de um micrótomo (criostato ANCAP 300). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção. Os animais cujas injeções não atingiram a amígdala bilateralmente foram excluídos do estudo.

3.8. Análise Estatística

Os experimentos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA de três fatores), onde o fator 1 foi o pré-tratamento recebido na exposição 1, o fator 2 foi o tratamento recebido na reexposição e fator 3 foi a interação entre a condição da exposição (exposição 1 e reexposição). Quando os valores de F foram significativos a análise foi seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. As variáveis relevantes foram a experiência ao teste e o tratamento realizado. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

4. RESULTADOS

A análise histológica confirmou que um total de 30 animais recebeu canulação positiva na amígdala (Figura 5). Desses, foram utilizados 14 sujeitos para investigar os efeitos de ondansetron tanto na exposição 1 e reexposição [veículo (n= 8) e ondansetron (n= 6)], e 16 animais receberam injeção de ondansetron apenas em uma das exposições [veículo e ondansetron (n= 8) e ondansetron e veículo (n= 8)] intra-amígdala.

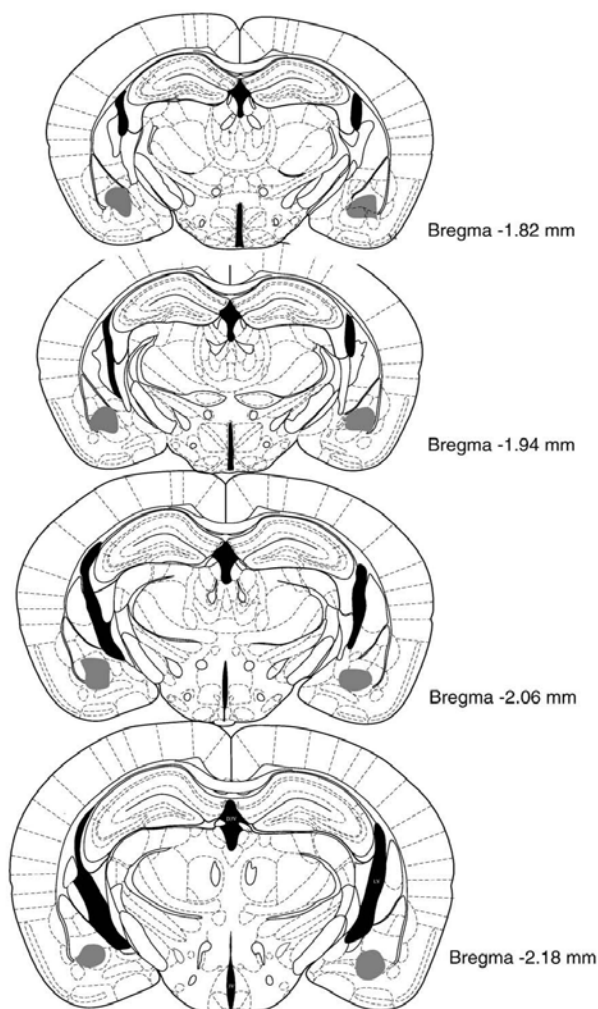


Figura 5. Representação esquemática dos sítios de injeção na amígdala de camundongos. A marcação em cinza nas figuras representa os sítios de injeção (Atlas de Franklin e Paxinos (1997)).

4.1. Efeito ansiolítico do ondansetron microinjetado na amígdala de camundongos avaliados durante a exposição 1 e reexposição ao LCE

Na Figura 6, a ANOVA de três fatores (pré-tratamento x tratamento x condição) mostrou que ocorreu alteração significativa dos índices de ansiedade nos seguintes comportamentos: *porcentagem de entrada nos braços abertos* [pré-tratamento ($F(1,26)= 21,83, p < 0,0001$); tratamento ($F(1,26)= 27,89, p < 0,05$); condição ($F(1,26)= 7,10, p < 0,05$)] e interação entre os três fatores, pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 8,43, p < 0,01$)]; *porcentagem de tempo gasto nos braços abertos* [pré-tratamento ($F(1,26)= 40,55, p < 0,0001$); tratamento ($F(1,26)= 9,75, p < 0,05$); interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento ($F(1,26)= 4,92, p < 0,05$); interação entre os fatores pré-tratamento e condição ($F(1,26)= 11,05, p < 0,05$) e interação entre os fatores tratamento e condição ($F(1,26)= 30,08, p < 0,001$), porém, sem efeito para a condição ($F(1,26)= 2,73, p > 0,05$) e interação entre os três fatores, pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 2,35, p > 0,05$)].

Para as *entradas nos braços fechados* nenhuma alteração significativa foi registrada [pré-tratamento ($F(1,26)= 1,02, p > 0,05$); tratamento ($F(1,26)= 2,28, p > 0,05$); condição ($F(1,26)= 1,15, p > 0,05$) e interação entre os três fatores, pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 0,90, p > 0,05$)].

Análises de *post hoc* mostraram que o pré-tratamento (exposição 1) e tratamento (reexposição) com ondansetron na amígdala de camundongos, produziram aumento das *porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos* do labirinto (índices de ansiedade), comparados aos animais

que receberam veículo, exposição 1 e reexposição ($p < 0,05$), ou seja, efeito ansiolítico.

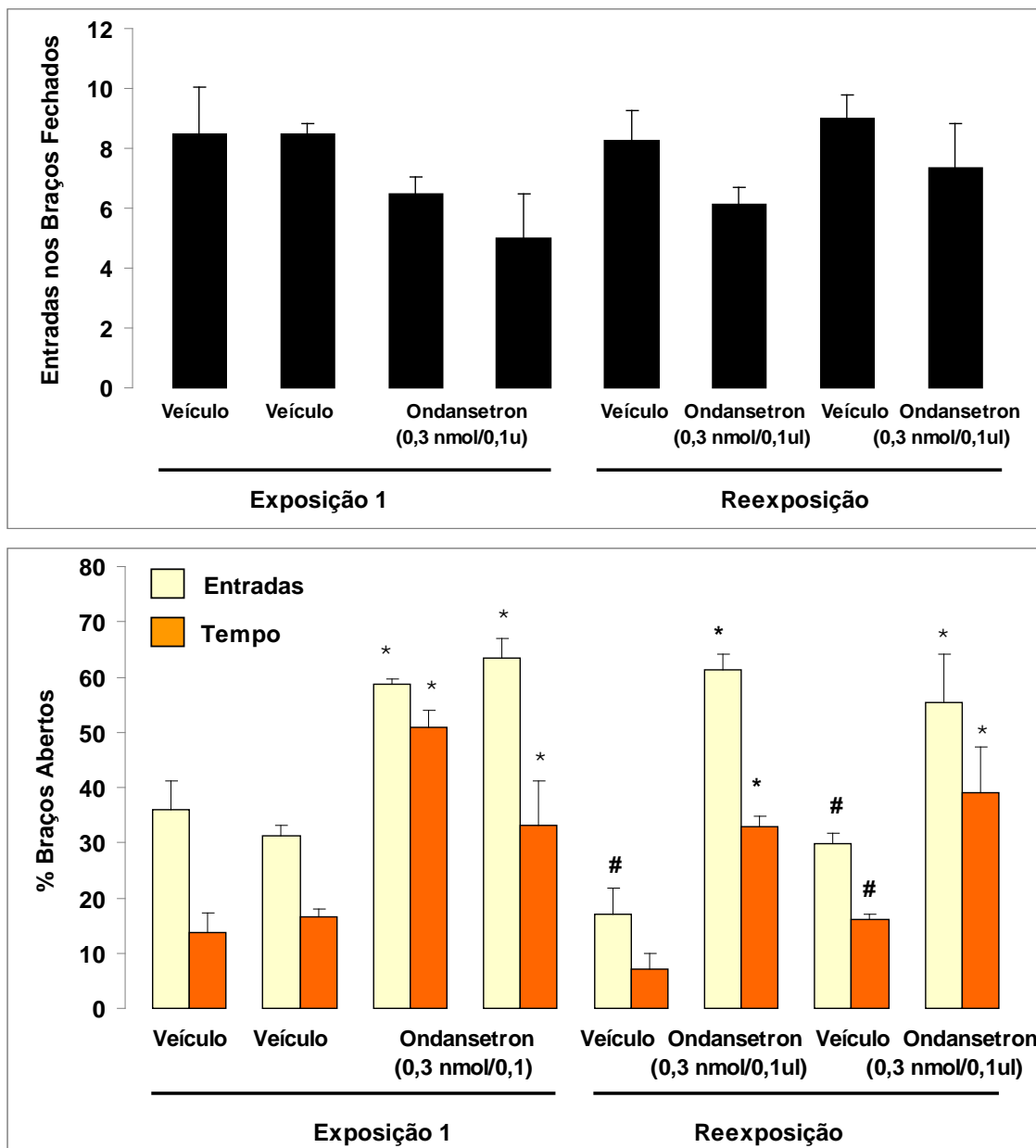


Figura 6. Efeito das injeções na amígdala de ondansetron (0,3 nmol/0,1) sobre a frequência de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, durante a exposição 1 e reexposição de camundongos no LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) (n= 9-10).

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo veículo.

$p < 0,05$ comparado à exposição 1.

As análises mostraram também que ocorreu interação entre pré-tratamento, tratamento e condição, isto é, que a reexposição promoveu diminuição significativa das *porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos* do labirinto (efeito ansiogênico). Este efeito foi produzido nos grupos [veículo (exposição 1) e veículo (reexposição), ondansetron (exposição 1) e veículo (reexposição)], enquanto não alterou a *porcentagem tempo gasto nos braços abertos* no grupo tratado com veículo (exposição 1) e veículo (reexposição). Ocorreu efeito da condição, ou seja, na reexposição houve aumento dos índices de ansiedade nos animais que receberam injeção de ondansetron na reexposição, no grupo veículo (exposição 1) e ondansetron (reexposição).

Nenhum dos tratamentos afetou a atividade locomotora ($p > 0,05$) (Figura 6).

Em relação aos outros comportamentos (Tabela 1), a ANOVA de três fatores (pré-tratamento x tratamento x condição), mostrou efeito significativo para as *entradas nos braços abertos* [pré-tratamento ($F(1,26) = 14,75$, $p < 0,05$); tratamento ($F(1,26) = 18,33$, $p < 0,05$) e interação entre tratamento e condição ($F(1,26) = 41,49$, $p < 0,05$); porém, sem efeito para condição ($F(1,26) = 0,46$, $p > 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26) = 1,12$, $p > 0,05$)] e *porcentagem de tempo gasto nos braços fechados* [pré-tratamento ($F(1,26) = 14,81$, $p > 0,05$), condição ($F(1,26) = 17,63$, $p > 0,05$), interação entre o pré-tratamento e condição ($F(1,26) = 10,05$, $p < 0,01$) e interação entre tratamento e condição ($F(1,26) = 13,46$, $p > 0,01$). Entretanto, a ANOVA não mostrou efeito do tratamento ($F(1,26) = 0,95$, $p > 0,05$), nem da interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26) = 0,003$, $p > 0,05$);

porcentagem de tempo gasto no centro do labirinto [efeito significativo da condição ($F(1,26)= 6,11, p < 0,05$); e sem efeito para o pré-tratamento ($F(1,26)= 0,47, p > 0,05$), tratamento ($F(1,26)= 1,54, p > 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 1,82, p > 0,05$)] e *total de entradas no labirinto* [efeito significativo da interação entre tratamento e condição ($F(1,26)= 17,62, p < 0,05$); porém sem efeito para o pré-tratamento ($F(1,26)= 1,85, p > 0,05$), tratamento ($F(1,26)= 1,35, p > 0,05$), condição ($F(1,26)= 0,01, p > 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 0,05, p > 0,05$)].

Comportamentos	Exposição 1				Reexposição			
	Veículo	Veículo	OND	OND	Veículo	OND	Veículo	OND
Total Entradas	14,4 ± 0,8	12,4 ± 0,4	15,6 ± 1,1	12,5 ± 2,7	10,0 ± 1,1	15,7 ± 0,8	12,9 ± 1,2	16,7 ± 2,0
Entradas nos Braços Abertos	5,9 ± 0,8	3,9 ± 0,3	9,1 ± 0,6*	7,5 ± 1,3*	1,7 ± 0,6#	9,6 ± 0,6*#	3,9 ± 0,4#	9,3 ± 2,0*
%Tempo nos Braços Fechados	49,1 ± 3,6	56,3 ± 2,0	23,7 ± 3,8*	32,4 ± 8,0*	64,1 ± 7,4	47,7 ± 4,4	58,5 ± 1,7#	44,2 ± 6,8*
%Tempo no centro	37,3 ± 5,1	27,1 ± 1,4	25,3 ± 1,8	34,6 ± 13,3	28,8 ± 5,5	19,3 ± 4,1	25,4 ± 2,0	16,8 ± 2,8
Total mergulhos	23,5 ± 2,9	15,7 ± 2,1	20,6 ± 3,8	34,0 ± 7,5*	10,6 ± 4,1	6,5 ± 2,5	11,6 ± 3,4	34,3 ± 5,1*
%Mergulhos protegidos	45,2 ± 11,0	54,6 ± 7,5	37,0 ± 8,5	29,4 ± 7,5	23,9 ± 9,2	77,6 ± 10,9*	76,1 ± 6,6*	25,1 ± 8,3
Total Esticadas	21,1 ± 5,2	11,0 ± 1,4	11,1 ± 1,6	13,5 ± 5,4	21,7 ± 5,2	7,0 ± 1,0*	11,2 ± 2,2	14,8 ± 2,3
%Esticadas Protegidas	30,1 ± 11,4	91,8 ± 2,0*	70,6 ± 7,0*	65,6 ± 5,7*	5,7 ± 2,7	91,9 ± 4,7*	81,4 ± 5,1*	54,5 ± 9,3*
Total Levantamentos	13,4 ± 2,2	8,0 ± 2,3	15,2 ± 3,9	13,0 ± 3,8	12,1 ± 1,7	7,9 ± 1,7	12,2 ± 2,7	16,2 ± 2,0
Total Imobilidade	2,4 ± 2,2	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	7,1 ± 3,8	5,9 ± 4,9	0,8 ± 0,6	0,0 ± 0,0	2,6 ± 2,1

Tabela 1. Efeito das injeções na amígdala de ondansetron (0,3 nmol/0,1 µl) sobre os outros comportamentos avaliados durante a exposição 1 e reexposição de camundongos no LCE. Os valores representam as médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) ($n= 9-10$).

* $p < 0,05$ comparado ao respectivo veículo (ANOVA seguido Duncan).

$p < 0,05$ comparado à exposição 1.

O *post hoc* mostrou, em ambas as exposições 1 e reexposição, que o ondansetron (OND), aumentou as *entradas nos braços abertos* do labirinto comparado ao respectivo veículo, ou seja, efeito ansiolítico. Apesar da ANOVA não ter apresentado efeito da condição, ocorreu efeito da interação dos três fatores, portanto a reexposição ao LCE produziu aumento da ansiedade nos grupos, veículo (exposição 1) e veículo (reexposição), ondansetron (exposição

1) e veículo (reexposição); enquanto diminuiu a ansiedade no grupo, veículo (exposição 1) e ondansetron (reexposição). Nenhum efeito da condição (exposição 1 x reexposição) foi observado no grupo ondansetron (exposição 1) e ondansetron (reexposição). Além disso, apesar da ANOVA não ter apresentado efeito do tratamento com ondansetron, ocorreu interação entre o pré-tratamento e condição, e interação entre tratamento e condição. Portanto, o ondansetron produziu diminuição da *porcentagem de tempo gasto nos braços fechados* do labirinto comparado ao respectivo veículo.

Em relação ao *total de entradas e porcentagem de tempo gasto no centro* do labirinto, o *post hoc* não mostrou efeito significativo para o pré-tratamento, tratamento, condição e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição.

A análise das medidas etológicas mostrou diferença significativa para os seguintes comportamentos: *total de mergulhos* [pré-tratamento ($F(1,26)= 14,17$, $p < 0,001$), tratamento ($F(1,26)= 4,28$, $p < 0,05$), condição ($F(1,26)= 7,37$, $p < 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F(1,26)= 16,31$, $p < 0,001$) e sem efeito para a interação do pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 0,22$, $p > 0,05$)]; *porcentagem de mergulhos protegidos* [interação entre pré-tratamento e tratamento ($F(1,26)= 16,71$, $p < 0,001$), interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 14,99$, $p < 0,001$), enquanto não houve alteração do pré-tratamento ($F(1,26)= 1,01$, $p > 0,05$), tratamento ($F(1,26)= 0,06$, $p > 0,05$) e condição ($F(1,26)= 2,04$, $p > 0,05$)]; *total de esticadas* [interação entre pré-tratamento e tratamento ($F(1,26)= 6,66$, $p < 0,05$), porém não ocorreu alteração significativa para o pré-tratamento ($F(1,26)= 0,73$, $p > 0,05$), tratamento ($F(1,26)= 2,52$, $p > 0,05$), condição

($F(1,26)= 0,07, p > 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 0,82, p > 0,05$); *porcentagem de esticadas protegidas* [pré-tratamento ($F(1,26)= 7,23, p < 0,05$); tratamento ($F(1,26)= 34,61, p < 0,05$); interação entre pré-tratamento e tratamento ($F(1,26)= 82,53, p < 0,001$), e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 5,56, p < 0,05$); porém, sem efeito para condição ($F(1,26)= 1,62, p > 0,05$); e *total de imobilidade* [interação significativa entre pré-tratamento e tratamento ($F(1,26)= 8,30, p < 0,05$); enquanto nenhum efeito significativo foi registrado para pré-tratamento ($F(1,26)= 0,05, p > 0,05$), tratamento ($F(1,26)= 0,28, p > 0,05$), condição ($F(1,26)= 0,02, p > 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 1,11, p > 0,05$)].

Nenhum efeito significativo foi registrado para o *total de levantamentos* [pré-tratamento ($F(1,26)= 2,09, p > 0,05$), tratamento ($F(1,26)= 0,78, p > 0,05$), condição ($F(1,26)= 0,004, p > 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento x condição ($F(1,26)= 1,32, p > 0,05$)].

O *post hoc* para as medidas etológicas mostrou que o ondansetron aumentou o *total de mergulhos* quando comparado ao respectivo veículo, tanto na exposição 1 como na reexposição. Apesar da ANOVA ter mostrado efeito da condição (exposição 1 e reexposição), este efeito não foi confirmado no teste de Duncan.

O *post hoc* mostrou que o tratamento com ondansetron produziu aumento da *porcentagem de mergulhos protegidos* apenas na reexposição, nos grupos [veículo (exposição 1) e ondansetron (reexposição), ondansetron (exposição 1) e veículo (reexposição)], respectivamente comparados ao veículo (exposição 1) e veículo (reexposição).

Em relação ao *total de esticadas*, ocorreu diminuição para grupo veículo (exposição 1) e ondansetron (reexposição) na reexposição, comparado ao grupo veículo (exposição 1) e veículo (reexposição). Para a *porcentagem de esticadas protegidas*, ocorreu aumento desta medida nos seguintes grupos: veículo (exposição 1) e ondansetron (reexposição), ondansetron (exposição 1) e veículo (reexposição), ondansetron (exposição 1) e ondansetron (reexposição), tanto na exposição 1 como na reexposição, quando comparados ao respectivo grupo veículo (exposição 1) e veículo (reexposição).

Para o *total de imobilidade*, apesar da ANOVA ter apresentado efeito da interação entre pré-tratamento e tratamento, este efeito não foi confirmado no post hoc.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a injeção intra-amídala de ondansetron (0,3 nmol), antagonista seletivo dos receptores 5-HT₃, produziu efeito ansiolítico tanto em camundongos ingênuos quanto em camundongos reexpostos ao LCE. Além disso, o efeito ansiolítico do ondansetron parece não depender da memória emocional do evento aversivo (reexposição), porque quando foi feita a injeção de ondansetron (exposição 1) e veículo (reexposição), o efeito ansiolítico não foi mantido em nenhum dos índices de ansiedade.

O labirinto em cruz elevado é um bom modelo de ansiedade e seu uso é baseado no estudo do comportamento incondicionado e espontâneo do animal (Rodgers e Dalvi, 1995). Dessa forma, já está bem relatado na literatura o seu uso para detectar os efeitos, tanto ansiogênicos quanto ansiolíticos de algumas drogas, como por exemplo, benzodiazepínicos (para revisão, Carobrez e Bertoglio, 2005). Porém, ainda é muito controverso e até mesmo, complexo, o entendimento do mecanismo de ação das drogas serotoninérgicas.

Dessa forma, sabe-se que em testes com camundongos submetidos ao LCE, o WAY 100635, antagonista dos receptores 5-HT_{1A} administrado no hipocampo ventral (Nunes-de-Souza et al, 2002), e no núcleo mediano da rafe (NMR) (Canto-de-Souza et al, 2002), produziu efeito ansiolítico. Porém, este mesmo antagonista, quando microinjetado no hipocampo dorsal e núcleo dorsal da rafe, não alterou a resposta de ansiedade avaliada no LCE (Canto-de-Souza et al, 2002; Nunes-de-Souza et al, 2002).

A ativação ou bloqueio de outros subtipos de receptores de serotonina também tem produzido diferentes resultados. Neste sentido, agonista e antagonista dos receptores 5-HT₂ produziram respectivamente, efeito ansiolítico e bloqueio deste efeito, quando administrados na SCP de camundongos (Nunes-de-Souza et al, 2008). Todavia, em estudos anteriores, foi observado efeito ansiogênico com injeções locais de agonistas dos receptores 5-HT₂, na amígdala ou hipocampo de ratos e camundongos avaliados no LCE (Cruz et al., 2005; Cornélio e Nunes-de-Souza, 2007).

A amígdala é considerada um sítio crítico para aquisição da memória do medo aprendido em mamíferos, e a formação e manutenção em longo prazo de memória de medo estão associadas com mudanças sinápticas nesta estrutura. A serotonina, por sua vez, é um neurotransmissor conhecido por modular o medo aprendido e o comportamento emocional, e apresenta efeito dual na transmissão sináptica excitatória na amígdala basolateral (Huang e Kandel, 2007).

Outros estudos também têm mostrado que a ativação e/ou bloqueio de receptores serotoninérgicos pré- e pós-sinápticos parece afetar a aprendizagem e a memória (Molodtsova, 2008).

Em relação aos receptores 5-HT₃, alguns estudos tem demonstrado diversos resultados em relação à modulação da ansiedade. Assim, a administração sistêmica de ondansetron produziu efeito ansiolítico em camundongos (Costall et al., 1989) e ratos (Costall et al., 1989; Griebel et al., 1996) porém, em outros estudos o ondansetron administrado em ratos não produziu efeito (Eguchi et al., 2001). Mas, quando as injeções deste antagonista, foram realizadas na amígdala de ratos (Tomkins et al., 1990) e

camundongos (Marucci e Canto-de-Souza, 2006, Laine et al., 2011 submetido), bem como no nosso estudo, ocorreu efeito ansiolítico.

Além das medidas convencionais, as medidas etológicas de posturas de esticar o corpo e mergulhar a cabeça, têm sido utilizadas para fornecer dados de avaliação de risco e exploração, respectivamente, no labirinto (Griebel et al., 1997; Rodgers et al, 1997a). Os nossos resultados na exposição 1 mostram que o ondansetron intra-amídala, promoveu efeito ansiolítico, observados na avaliação de risco e exploração. Entretanto, não houve diferença na atividade vertical (total de levantamentos) e tomada de decisão (% tempo no centro), bem como na atividade locomotora (total de entradas) (Tabela 1).

Resultado diferente foi obtido com injeção do ondansetron no hipocampo ventral, ou seja, este antagonista produziu aumento da ansiedade avaliada em camundongos (Fachini e Canto-de-Souza, 2008). A ausência de efeito sobre a ansiedade também já foi observada em outros estudos quando este antagonista foi administrado sistemicamente em camundongos (Rodgers e Dalvi, 1997), e ratos (File e Johnston, 1989; Olivier et al, 2000).

Portanto, vários trabalhos já descritos na literatura apontam para o efeito ansiolítico obtido após o bloqueio dos receptores 5-HT₃ com antagonistas seletivos, independentemente do tipo de administração, sistêmica ou central, ou da estrutura avaliada (para revisão, Barnes e Sharp, 1999). Além disso, evidências genéticas têm demonstrado que a deleção do gene responsável pelo receptor 5-HT₃ em camundongos produziu efeito ansiolítico quando os mesmos foram avaliados no LCE (Kelly et al., 2003). Diante do exposto, os nossos resultados confirmam o importante papel da serotonina na amídala, na

modulação da resposta de ansiedade avaliada em camundongos ingênuos ao labirinto.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a reexposição de ratos e camundongos ao labirinto, aumenta a evitação dos braços abertos deste aparato (Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002; Canto-de-Souza et al., 2002; Nunes-de-Souza et al., 2002; Reis e Canto-de-Souza, 2008), fenômeno este, que se refere à tolerância de uma única exposição (OTT) (File et al, 1990). Este fenômeno, por sua vez, promove alteração significativa nos comportamentos de animais previamente expostos ao LCE e, assim, o perfil do reteste pode ser indicativo da sensibilização do medo (Rodgers et al, 1997b).

Neste estudo, injeções locais de ondansetron na amígdala de camundongos, produziram efeito ansiolítico tanto na exposição 1 quanto na reexposição ao LCE. Resultado semelhante ao nosso, foi observado com a administração de midazolam nesta mesma estrutura, em camundongos (Barbalho et al., 2009). Desta forma, podemos sugerir que o ondansetron além de diminuir o conflito entre aproximação e esquiva (McNaughton e Corr, 2004), inibe o comportamento aversivo dos braços abertos quando injetado na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE.

Contudo, o que foi avaliado na segunda exposição provavelmente envolva outro tipo de emoção como o medo (File, 1993), uma vez que este é descrito como uma ameaça conhecida, externa e definida (Graeff, 1989; Blanchard et al, 1990).

A maioria dos resultados encontrados na literatura tem demonstrado que ocorre a perda ou ausência do efeito ansiolítico pela administração de fármacos que atuam nos receptores benzodiazepínicos (BDZs), durante a

reexposição ao LCE (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002). Pesquisas que buscam a investigação de estruturas do SNC que podem estar envolvidas no fenômeno OTT, até o momento demonstraram que os receptores da SCP envolvidos são do tipo GABA-BDZ e serotoninérgicos dos subtipos 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (Reis e Canto-de-Souza, 2008; Gomes e Nunes-de-Souza, 2009).

Como já é bem elucidado a serotonina possui papel dual, dependendo do seu sítio de ação e do seu subtipo de receptor e assim, receptores 5-HT_{2C} no complexo amidalóide exercem papel facilitatório da ansiedade em camundongo expostos ao LCE (Cornélio e Nunes-de-Souza, 2007).

Porém, os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo ventral e do núcleo mediano da rafe, bem como, os receptores GABA-BDZ da amígdala, parecem não estar envolvidos com o fenômeno OTT (Nunes-de-Souza et al., 2002; Canto-de-Souza et al., 2002; Barbalho et al., 2009).

Além disso, nenhum estudo tinha mostrado ainda que o efeito ansiolítico do ondansetron pudesse ser mantido após a reexposição dos animais ao mesmo aparato. Portanto, a modulação serotoninérgica na amígdala de camundongos avaliados no labirinto parece apresentar um papel ansiogênico o que corrobora estudos anteriores (Higgins et al., 1991; Deakin e Graeff, 1991, Nunes-de-Souza et al., 2000). Entretanto, devido aos diferentes núcleos localizados nesta estrutura, com diversas sub-populações de receptores, a literatura já demonstra resultados conflitantes e inconsistentes quando diversas drogas são infundidas em núcleos específicos da amígdala (Engin e Treit, 2008).

O presente resultado, corrobora dados anteriores do nosso laboratório obtidos com a administração de midazolam na amígdala (Barbalho et al, 2009),

o que sugere que esse fenômeno da OTT seja modulado por outras vias e/ou por outros receptores de serotonina. Portanto, embora a amígdala seja uma das importantes estruturas do SNC envolvida na neurobiologia das reações de defesa, tais como a resposta de ansiedade, no que se refere ao fenômeno OTT ela parece não participar.

6. CONCLUSÃO

Assim, diante dos resultados obtidos concluímos que:

- A injeção local de ondansetron, na amígdala de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado durante a exposição 1 e a reexposição, produziu efeito ansiolítico.
- A serotonina endógena está atuando como ansiogênica nos receptores 5-HT₃ da amígdala.
- A amígdala não modula o fenômeno de tolerância de uma exposição (OTT), uma vez que o antagonista dos receptores 5-HT₃ produziu efeito ansiolítico em ambas as exposições de camundongos ao labirinto em cruz elevado.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, D.B. Brain mechanisms of offense, defense and submission. *The behavioral and Brain Sciences*. 1979, 2, 201-241.

ALBRECHET-SOUZA, L., BORELLI, K.G., BRANDÃO, M.L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *J Neurosci Methods*. 2008, 169, 1, 109-18.

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

BARD, P. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *Am J Phys*. 1928, 84, 490-410.

BARNES, N.M., SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 1999, 38, 1083–152.

BARNES, N.M, et al. The 5-HT₃ receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology*. 2009, 56, 1, 273-84.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arm avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioral. Brain Research*. 2000, 108, 197–203.

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

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behavioural Pharmacology*. 2004, 15, 45–54.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*. 1972, 81, 2, 281-290.

BLANCHARD, D.C., WILLIAMS, G., LEE, E.M.C., BLANCHARD, R.J. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiological Psychology*. 1981, 9, 157-163.

BLANCHARD R.J., BLANCHARD D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*. 1988, 39, 43-68.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., RODGERS, R.J. Pharmacology and neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggressive Behavioral*. 1990, 16, 165-176.

BLANCHARD, R.J., YUDKO, E.B., RODGERS, R.J. AND BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety, *Behav. Brain Res*. 1993, 58, 155–165.

BLANCHARD, D.C, GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2001, 25, 205-218.

BOVIER, P., BROEKKAMP, C.L., LLOYD, K.G. Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. *Brain Res*. 1982, 248, 2, 313-320.

BRANDÃO, M.L., CARDOSO, S.H., MELO, L.L., MOTTA, V., COIMBRA, N.C. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1994, 18, 339-346.

BRANDÃO, M.L., et al. Neurochemical mechanisms of defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*. 1999, 23, 863-875.

BRANDÃO, M.L. Comportamento emocional In: BRANDÃO, M.L. *Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento*. São Paulo: Editora Atheneu, 2001, 125-149.

BRANDÃO, M.L., VIANNA, D.M., MASSON, S., SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003, 25, Supl II, 36-41.

BUTLER, A., HILL, J.J., IRELAND, S.J., JORDAN, C.C., TYERS, M.B. Pharmacological properties of GR38032F, a novel antagonist at 5-HT₃ receptor. *Br J Pharmacol.* 1988, 94, 397-412.

CANTERAS, N.S., GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport.* 1999, 10, 2, 413-418.

CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002, 71, 3, 481-491.

CANTERAS, N.S. Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. 2008. In Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Griebel, G., e Nutt, D.J. (Eds.), *Handbook of anxiety and fear.* Amsterdam: Elsevier academic press.

CANTO-DE-SOUZA, A., NUNES-DE-SOUZA, R.L., RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Research.* 2002, 928, 1-2, 50-59.

CANNON, W.B. The James–Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. *Am. J. Psychol.* 1927, 39, 106–124.

CAROBREZ, A.P., BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxietylike behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience Biobehavioral Reviews.* 2005, 29, 1193–1205.

CORNÉLIO, A.M., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav Brain Res.* 2007, 178, 82–89.

COSTALL, B., et al. The effects of ondansetron (GR 38032F) in rats and mice treated subchronically with diazepam. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989, 34, 769-778.

CRUZ, A.P., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behaviour on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994, 49, 171-176.

CRUZ, A. P.M., ZANGROSSI, H. & GRAEFF, F.G. Psicobiologia da ansiedade. Em: RangéB.P. (org) Psicoterapia comportamental e cognitiva: pesquisa, prática, aplicações e problemas. Campinas: Editorial Psy. 301-312, 1995.

DÁL-COL, M.L.C., et al. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of trial 1. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 74, 2, 395–400.

DALGLEISH, T. The emotional brain. *Nature Reviews Neuroscience.* 2004, 5, 583-589.

DAMASIO, A.R. et al. Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions. *Nature Neurosci.* 2000, 3, 1049–1056.

DEAKIN, J.F.W., GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol.* 1991, 5, 305-315.

DEGROOT, A., TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res.* 2004, 1001, 1-2, 60-71.

DEL-BEN C.M., et al. Serotonergic modulation of face-emotion recognition. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2008, 41, 263-269.

ENGIN E., TREIT D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008, 1, 32, 6, 1399-419.

ESPEJO, E.F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research.* 1997, 87, 233-238.

EGUCHI, A.J., INOMATAB, Y., SAITO, K. The anxiolytic-like effect of MCI-225, a selective NA reuptake inhibitor with 5-HT₃ receptor antagonism. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001, 68, 677-683.

FACHINI, G., CANTO-DE-SOUZA, A. Efeito ansiogênico do ondansetron microinjetado no hipocampo ventral de camundongos. In: Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. XXI Reunião Anual, Águas de Lindóia, SP, 2006.

FACHINI, G., CANTO-DE-SOUZA, A.L.M., Intra-ventral hippocampus injections of ondansetron increase anxiety in mice exposed in elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* (submetido), 2008.

FAERBER, L., et al. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research — Evolving concepts in management of pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2007, 560,1–8.

FERNANDES, C., FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 1996, 54, 31–40.

FILE, S.E., MABBUTT, P.S., HITCHOTT, P.K. Characterization of phenomenon of 'one-trial tolerance' to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 1990, 102, 98–101.

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

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. 1992. In: ELLIOTT, J.M., HEAL, D.J., MARSDEN, C.A. *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. J. Wiley, Chichester, 25-44.

FILE, S.E., Zangrossi, H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*. 1993, 110, 1-2, 240-4.

FILE S.E., et al. Trial 2 in the elevated plus-maze: A different form of fear? *Psychopharmacology*. 1993, 111, 491-494.

FRANKLIN, K.B.J., PAXINOS, G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, New York: Academic Press, 1997.

FRUSSA-FILHO, R., RIBEIRO, R.A. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sci*. 2002, 21, 71, 5, 519-25.

GARCIA, A., CARDENAS, F., MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*. 2005, 85, 265-270.

GIANLORENÇO, A.C., CANTO-DE-SOUZA, A., MATTIOLI, R. L-histidine induces state-dependent memory deficit in mice mediated by H1 receptor. *Prog. Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.09.006.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*. 1994, 27, 4, 811-829.

GRAEFF, F.G. *Drogas Psicotrópicas e Seu Modo de Ação*. 2ª edição revista e ampliada. EPU Editora, 1998.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H., DEN BOER, J.A., WESTENBERG, H., WILLNER, P. (eds.). *Textbook of biological psychiatry*. John Wiley & Sons, London, pp. 879-893, 2002.

GRAY, J. A. *The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry into the Function of the Septo-Hippocampal System*. Clarendon, Oxford, 1982.

GRAY, J.A., MCNAUGAHTON, N. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo- hippocampal system*. 2nd ed. Oxford University Press, London, England. 2000, 37, 784-457.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther*. 1995, 65, 319-395.

GRIEBEL, G., SANGER, D.J., PERRAULT, G. The use of the rat plus-maze to discriminate non selective and BZ-1 (ω 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology*. 1995, 124, 245-254.

GRIEBEL, G., RODGER, R.J., PERRAULT, G., SANGER, D.J. Risk assessment behavior: evaluation of utility in the study of 5-HT related drugs in the rat elevated plus- maze test. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997, 57, 817-827.

GOMES, K.S., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009, 1, 33, 7, 1261-9.

HANDLEY, S.L., MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration model of "fear"- motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1984, 327, 1-5.

HANNON, J., HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008, 16, 195, 1, 198-213.

HESS, W.R., BRUGGER, M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta*. 1943, 1, 33-52.

HENSLER, J.G., HODGE, C.W., OVERSTREET, D.H. Reduced 5-HT₃ receptor binding and lower baseline plus maze anxiety in the alcohol-preferring inbred fawn-hooded rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004, 77, 281-289.

HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Editora Atheneu, 55-74, 2004.

HIGGINS, G.A., et al. Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT₃ receptor antagonist. *Psychopharmacology*. 1991, 104, 545-551.

HOYER, D., et al. International union of pharmacological classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Sci*. 1994, 14, 233-236.

HOYER, D., MARTIN, G. 5-HT receptor classification and nomenclature towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 1997, 36, 4-5, 419-428.

HOLMES, A., RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neuroscience Biobehavioral Review*. 1998, 23, 971-980.

HUANG, Y.Y., KANDEL, E.R. 5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala. *J Neurosci.* 2007, 21, 27, 12, 3111-9.

HUNSPERGER, R.W. Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1956, 14, 70-92.

JONES, B.J., et al. The potential anxiolytic activity of GR38032F, 5-HT₃ receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 1988, 93, 985-993.

KELLEY, S.P., BRATT, A.M., HODGE, C.W. Targeted gene deletion of the 5-HT_{3A} receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice. *Eur J Pharmacol.* 2003, 7, 461, 1, 19-25.

KLUVER, H., BUCY, P.C. 'Psychic blindness' and other symptoms following bilateral temporal lobectomy. *Am. J. Physiol.* 1937, 119, 254–284.

LAINÉ, L., BAPTISTA, D., MARUCCI, F. A. F., CANTO-DE-SOUZA, A. Administração de ondansetron na amígdala de camundongos produz efeito ansiolítico. In: I IBRO/LARC de Neurociências da America Latina, Caribe e Península Ibérica, Búzios. 2008.

LAINÉ, L., BAPTISTA, D., MARUCCI, F.A.F., CANTO-DE-SOUZA, A.L.M. O papel dos receptores 5-HT₃ da amígdala na modulação da ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (submetido), 2011.

LEDOUX, J. E. Sensory systems and emotion: a model of affective processing. *Integr. Psychiatry.* 1986, 4, 237–248.

LEDOUX, J.E. Emotion and the amygdala. In J. P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction.* New York: Wiley-Liss. 1992, 339- 351.

LEDOUX, J., *The emotional brain: The mysterious underpinnings of emotional life.* New York: Simon and Schuster. 1998.

LEDOUX, J. The amygdala. *Current Biology,* 2007, Volume 17, Issue 20, R868-R874.

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

MACLEAN, P.D. in *The Neurosciences. Second Study Program* (ed. Schmidt, F. O.) 336–349. Rockefeller Univ. Press, New York, 1970.

MARUCCI, F.A.F., CANTO-DE-SOUZA, A. Microinjeção de antagonista dos receptores 5-HT₃ na amígdala de camundongos produz efeito ansiolítico. In: *Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. XXI Reunião Anual, Águas de Lindóia, SP, 2006.*

MCNAUGHTON, N., CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004, 8, 3, 285-305.

MESSIER, C., ÉMOND, S., ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1999, 63, 431-438.

MOLODTSOVA, G.F. Serotonergic mechanisms of memory trace retrieval. *Behavioural Brain Research*. 2008, 195, 7–16.

NIEMINEM, S.A., et al. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. *Physiology Behaviour*. 1992, 51, 845-849.

NUNES-DE-SOUZA, R.L., et al. Anxiety-induced antinociception in mice of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology*. 2000, 150, 300-310.

NUNES-DE-SOUZA, R.L., CANTO-DE-SOUZA, A., RODGERS, R.J. Effects of intrahippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice: Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Research*. 2002, 927, 1, 87-96.

NUNES-DE-SOUZA, V., et al. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavioural Brain Research*. 2008, 187, 72-79.

OLIVIER, B., VANWIJNGAARDEN, I., SOUDIJN, W. 5-HT₃ receptors antagonist and anxiety: a preclinical and clinical review. *Eur Neuropsychopharm.* 2000, 10, 77-95.

PAPEZ, J.W. A proposed mechanism of emotion. *Arch. Neurol. Psychiatry.* 1927, 38, 725–743.

PARE, D., QUIRK, G.J., LEDOUX, J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiology.* 2004, 92, 1-9.

PELLOW, S., et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985, 14, 149-167.

PENTKOWSKI, N.S., et al. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci.* 2006, 23, 8, 2185-2196.

RAINNIE, D.G. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Journal of neurophysiology.* 1999, 82, 69-85.

REIS, L.M., CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. *Brain Research.* 2008, 1231, 93-102.

RODGERS, R.J., SHEPHERD, J.K., Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology.* 1993, 113, 237–242.

RODGERS, R.J., COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology.* Wiley, Chichester, 1994, 9–44.

RODGERS, R.J., JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995, 52, 2, 297-303.

RODGERS, R.J., DALVI, A. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997, 21, 6, 801-810.

RODGERS, R.J. Animal models of anxiety: where next? *Behav Pharmacol.* 1997, 8, 477- 496.

RODGERS, R.J.; et al. A. Animal models of anxiety: na ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997a, 30, 289–304.

RODGERS, R.J., et al. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behavior to altered retest conditions. *Behavioural Brain Research.* 1997b, 86, 71-77.

SAH P., et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 2003, 83, 803-834.

SCHACHTER, S., SINGER, J.E. Cognitive, social, and physiological determinants of emotional state. *Psychol. Rev.* 1962, 69, 379–399.

SERAFIM, K.R.; et al. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res.* 2010, 43, 1, 100-106.

SILVA, R.H., FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *J Neurosci Methods.* 2000, 30, 102, 2, 117-25.

TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993, 44, 463-469.

TOMKINS, D.M., COSTALL, B., KELLY, M.E. Release of suppressed behaviour or rat on the elevated X-maze by 5-HT₃ receptor antagonists injected into the basolateral amygdala. *Journal Psychopharmacology.* 1990, 4, 262.

YAMASUE, H., et al. Gender-Common and –Specific Neuroanatomical Basis of Human Anxiety-Related Personality Traits. *Cerebral Cortex.* 2008, 18, 46-52.

YE, J.H., PONNUDURAI, R., SCHAEFER, R. Ondansetron: A Selective 5-HT₃ Receptor Antagonist and Its Applications in CNS-Related Disorders. *CNS Drug Reviews.* 2001, 7, 199–21.

ZANGROSSI, H., GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.,

GRAEFF, F.G. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Editora Atheneu, 55-74, 2004.

8. Apêndice

Quadro 1: Registro das medidas convencionais em camundongos expostos ao LCE após microinjeção intra-amídala de veículo como pré-tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
Veiculo	Veiculo	13	5	8	35,641	160,873	103,486	38,46154	61,53846	11,88033	53,62433	34,49533
Veiculo	Veiculo	19	1	18	0,922	199,39	99,688	5,263158	94,73684	0,307333	66,46333	33,22933
Veiculo	Veiculo	13	8	5	30,268	120,816	148,916	33,33333	66,66667	10,08933	40,272	49,63867
Veiculo	Veiculo	13	7	6	73,078	170,953	55,969	53,84615	46,15385	24,35933	56,98433	18,65633
Veiculo	Veiculo	13	8	5	30,268	120,816	148,916	33,33333	66,66667	10,08933	40,272	49,63867
Veiculo	Veiculo	14	7	7	96,863	155,609	47,528	50	50	32,28767	51,86967	15,84267
Veiculo	Veiculo	17	6	11	30,845	140,387	128,768	35,29412	64,70588	10,28167	46,79567	42,92267
Veiculo	Veiculo	13	5	8	29,656	109,419	160,925	38,46154	61,53846	9,885333	36,473	53,64167
	MEDIA	14,38	5,88	8,50	40,94	147,28	111,77	36,00	64,00	13,65	49,09	37,26
	DPM	2,33	2,30	4,31	29,87	30,26	42,96	14,57	14,57	9,96	10,09	14,32
	EPM	0,82	0,81	1,52	10,56	10,70	15,19	5,15	5,15	3,52	3,57	5,06

Quadro 2: Registro das medidas convencionais em camundongos expostos ao LCE após microinjeção intra-amídala de veículo como pré-tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
Veiculo	OND0,3	12	3	9	67,294	160,157	72,549	25	75	22,43133	53,38567	24,183
Veiculo	OND0,3	13	5	8	43,328	183,565	73,107	38,46154	61,53846	14,44267	61,18833	24,369
Veiculo	OND0,3	12	3	9	54,66	139,872	105,468	25	75	18,22	46,624	35,156
Veiculo	OND0,3	12	4	8	39,767	174	86,233	33,33333	66,66667	13,25567	58	28,74433
Veiculo	OND0,3	15	5	10	48,343	184,813	66,844	33,33333	66,66667	16,11433	61,60433	22,28133
Veiculo	OND0,3	12	4	8	36,033	187,547	76,42	33,33333	66,66667	12,011	62,51567	25,47333
Veiculo	OND0,3	11	4	7	48,659	164,985	86,356	36,36364	63,63636	16,21967	54,995	28,78533
Veiculo	OND0,3	12	3	9	61,438	155,362	83,2	25	75	20,47933	51,78733	27,73333
	MEDIA	12,38	3,88	8,50	49,94	168,79	81,27	31,23	68,77	16,65	56,26	27,09
	DPM	1,19	0,83	0,93	10,69	16,73	12,04	5,46	5,46	3,56	5,58	4,01
	EPM	0,42	0,30	0,33	3,78	5,92	4,26	1,93	1,93	1,26	1,97	1,42

Quadro 3: Registro das medidas convencionais em camundongos submetidos ao LCE após microinjeção intra-amídala de ondansetron (0,3 nmol/0,1µl) como pré-tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
OND0,3	Veiculo	20	12	8	144,548	64,845	90,607	60	40	48,18267	21,615	30,20233
OND0,3	Veiculo	15	9	6	187,358	34,375	78,267	60	40	62,45267	11,45833	26,089
OND0,3	Veiculo	18	10	8	150,331	74,42	75,249	55,55556	44,44444	50,11033	24,80667	25,083
OND0,3	Veiculo	19	11	8	114,281	124,155	61,564	57,89474	42,10526	38,09367	41,385	20,52133
OND0,3	Veiculo	13	8	5	166,752	38,667	94,581	61,53846	38,46154	55,584	12,889	31,527
OND0,3	Veiculo	11	7	4	124,155	98,208	77,637	63,63636	36,36364	41,385	32,736	25,879
OND0,3	Veiculo	13	7	6	159,516	92,235	48,249	53,84615	46,15385	53,172	30,745	16,083
OND0,3	Veiculo	16	9	7	176,265	43,158	80,577	56,25	43,75	58,755	14,386	26,859
	MEDIA	15,63	9,13	6,50	152,90	71,26	75,84	58,59	41,41	50,97	23,75	25,28
	DPM	3,20	1,81	1,51	24,97	32,13	14,96	3,29	3,29	8,32	10,71	4,99
	EPM	1,13	0,64	0,53	8,83	11,36	5,29	1,16	1,16	2,94	3,79	1,76

Quadro 4: Registro das medidas convencionais em camundongos submetidos ao LCE após microinjeção intra-amídala de ondansetron (0,3 nmol/0,1µl) como pré-tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
ONDO,3	ONDO,3	23	12	11	75,965	97,752	126,283	52,17391	47,82609	25,32167	32,584	42,09433
ONDO,3	ONDO,3	17	10	7	147,749	111,028	41,223	58,82353	41,17647	49,24967	37,00933	13,741
ONDO,3	ONDO,3	9	6	3	113,344	95,281	91,375	66,66667	33,33333	37,78133	31,76033	30,45833
ONDO,3	ONDO,3	4	3	1	10,107	0,906	288,987	75	25	3,369	0,302	96,329
ONDO,3	ONDO,3	12	7	5	70,344	186,174	43,482	58,33333	41,66667	23,448	62,058	14,494
ONDO,3	ONDO,3	10	7	3	177,609	91,421	30,97	70	30	59,203	30,47367	10,32333
	MEDIA	12,50	7,50	5,00	99,19	97,09	103,72	63,50	36,50	33,06	32,36	34,57
	DPM	6,66	3,15	3,58	60,03	59,02	97,79	8,50	8,50	20,01	19,67	32,60
	EPM	2,72	1,28	1,46	24,51	24,10	39,92	3,47	3,47	8,17	8,03	13,31

Quadro 5: Registro das medidas convencionais em camundongos expostos ao LCE após microinjeção intra-amídala de veículo como tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
Veiculo	Veiculo	8	1	7	3,609	268,14	28,251	12,5	87,5	1,203	89,38	9,417
Veiculo	Veiculo	12	1	11	31,781	206,703	61,516	8,333333	91,66667	10,59367	68,901	20,50533
Veiculo	Veiculo	13	4	9	56,578	107,673	135,749	30,76923	69,23077	18,85933	35,891	45,24967
Veiculo	Veiculo	5	1	4	5,344	266,267	28,389	20	80	1,781333	88,75567	9,463
Veiculo	Veiculo	13	4	9	56,578	107,673	135,749	30,76923	69,23077	18,85933	35,891	45,24967
Veiculo	Veiculo	9	3	6	15,033	210,08	74,887	33,33333	66,66667	5,011	70,02667	24,96233
Veiculo	Veiculo	13	0	13	0	159,629	140,371	0	100	0	53,20967	46,79033
Veiculo	Veiculo	7	0	7	0	212,546	87,454	0	100	0	70,84867	29,15133
	MEDIA	10,00	1,75	8,25	21,12	192,34	86,55	16,96	83,04	7,04	64,11	28,85
	DPM	3,16	1,67	2,87	24,24	62,73	46,73	13,78	13,78	8,08	20,91	15,58
	EPM	1,12	0,59	1,01	8,57	22,18	16,52	4,87	4,87	2,86	7,39	5,51

Quadro 6: Registro das medidas convencionais em camundongos expostos ao LCE após microinjeção intra-amídala de veículo como tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
Veiculo	ONDO,3	16	8	8	96,222	102,451	101,327	50	50	32,074	34,15033	33,77567
Veiculo	ONDO,3	18	11	7	84,08	160	55,92	61,11111	38,88889	28,02667	53,33333	18,64
Veiculo	ONDO,3	18	12	6	98,205	181,655	20,14	66,66667	33,33333	32,735	60,55167	6,713333
Veiculo	ONDO,3	17	9	8	80,871	130	89,129	52,94118	47,05882	26,957	43,33333	29,70967
Veiculo	ONDO,3	16	12	4	83,656	163,36	52,984	75	25	27,88533	54,45333	17,66133
Veiculo	ONDO,3	13	9	4	108,691	180	11,309	69,23077	30,76923	36,23033	60	3,769667
Veiculo	ONDO,3	12	7	5	126,048	78,28	95,672	58,33333	41,66667	42,016	26,09333	31,89067
Veiculo	ONDO,3	16	9	7	112,842	150	37,158	56,25	43,75	37,614	50	12,386
	MEDIA	15,75	9,63	6,13	98,83	143,22	57,95	61,19	38,81	32,94	47,74	19,32
	DPM	2,19	1,85	1,64	16,09	37,07	34,52	8,55	8,55	5,36	12,36	11,51
	EPM	0,77	0,65	0,58	5,69	13,10	12,21	3,02	3,02	1,90	4,37	4,07

Quadro 7: Registro das medidas convencionais em camundongos submetidos ao LCE após microinjeção intra-amídala de ondansetron (0,3 nmol/0,1µl) como tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
ONDO,3	Veiculo	15	4	11	44,407	172,785	82,808	26,66667	73,33333	14,80233	57,595	27,60267
ONDO,3	Veiculo	10	2	8	40,54	192,625	66,835	20	80	13,51333	64,20833	22,27833
ONDO,3	Veiculo	16	5	11	56,846	162,092	81,062	31,25	68,75	18,94867	54,03067	27,02067
ONDO,3	Veiculo	15	5	10	45,86	169,293	84,847	33,33333	66,66667	15,28667	56,431	28,28233
ONDO,3	Veiculo	11	4	7	41,093	151,735	107,172	36,36364	63,63636	13,69767	50,57833	35,724
ONDO,3	Veiculo	8	2	6	55,23	183,579	61,191	25	75	18,41	61,193	20,397
ONDO,3	Veiculo	11	4	7	56,78	191,907	51,313	36,36364	63,63636	18,92667	63,969	17,10433
ONDO,3	Veiculo	17	5	12	47,439	179,108	73,453	29,41176	70,58824	15,813	59,70267	24,48433
	MEDIA	12,88	3,88	9,00	48,52	175,39	76,09	29,80	70,20	16,17	58,46	25,36
	DPM	3,27	1,25	2,27	6,83	14,30	17,08	5,73	5,73	2,28	4,77	5,69
	EPM	1,16	0,44	0,80	2,41	5,06	6,04	2,03	2,03	0,80	1,69	2,01

Quadro 8: Registro das medidas convencionais em camundongos submetidos ao LCE após microinjeção intra-amídala de ondansetron (0,3 nmol/0,1µl) como tratamento.

PRETRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
ONDO,3	ONDO,3	17	4	13	34,123	196,829	69,048	23,52941	76,47059	11,37433	65,60967	23,016
ONDO,3	ONDO,3	16	11	5	148,907	110,393	40,7	68,75	31,25	49,63567	36,79767	13,56667
ONDO,3	ONDO,3	14	5	9	46,672	196,906	56,422	35,71429	64,28571	15,55733	65,63533	18,80733
ONDO,3	ONDO,3	26	17	9	178,467	99,358	22,175	65,38462	34,61538	59,489	33,11933	7,391667
ONDO,3	ONDO,3	12	7	5	134,559	89,502	75,939	58,33333	41,66667	44,853	29,834	25,313
ONDO,3	ONDO,3	15	12	3	158,89	103,281	37,829	80	20	52,96333	34,427	12,60967
	MEDIA	16,67	9,33	7,33	116,94	132,71	50,35	55,29	44,71	38,98	44,24	16,78
	DPM	4,89	4,93	3,67	61,11	50,15	20,42	21,42	21,42	20,37	16,72	6,81
	EPM	1,99	2,01	1,50	24,95	20,47	8,34	8,75	8,75	8,32	6,82	2,78