

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
UFSCar – CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Papel dos receptores 5-HT<sub>2</sub> da amígdala e hipocampo na modulação da  
ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado**

**Alianda Maira Cornélio**

São Carlos – SP  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
UFSCar – CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Papel dos receptores 5-HT<sub>2</sub> da amígdala e hipocampo na modulação da  
ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado**

**Alianda Maira Cornélio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**

São Carlos - SP  
2005

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

C814pr

Cornélio, Alianda Maira.

Papel dos receptores 5-HT<sub>2</sub> da amígdala e hipocampo na modulação da ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado / Alianda Maira Cornélio. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Psicofarmacologia. 2. Ansiedade. 3. mCPP. 4. Hipocampo. 5. Labirinto em cruz elevado. 6. Camundongo. I. Título.

CDD: 615.78 (20<sup>a</sup>)

Dedico este trabalho ao meu pai **Dorival** e principalmente à minha mãe, **Clélia** pelo incentivo e participação em todos os momentos da minha vida, sejam eles tristes ou alegres. A vocês, minha gratidão e amor por tudo que fizeram e fazem por mim.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que nos deu o dom da vida e da sabedoria.

Ao prof. Dr. **Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pela orientação científica, amizade e dedicação. Sua orientação me fez crescer tanto cientificamente como pessoalmente, a você minha admiração, respeito e gratidão.

Aos professores Dr. **Silvio Morato de Carvalho**, Dra. **Cleopatra da Silva Planeta** e Dra. **Débora Simões de Almeida Colombari** pelas valiosas sugestões, durante o exame de qualificação, que muito contribuíram para este trabalho.

À **banca examinadora**, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Aos professores Dra. **Maria do Carmo Longo** e Dr. **José Francisco Fracasso**, pela amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Dra. **Azair Liane Matos do Canto de Souza**, pela sua atenção e disposição em ajudar a qualquer momento.

Aos professores da toxicologia Dr. **José Salvador Lepera**, Dra. **Rosângela Gonçalves Peccinini Machado** e Dr. **Georgino Honorato de Oliveira**, pelo gentil empréstimo dos aparelhos utilizados nas técnicas experimentais.

Às técnicas do laboratório de farmacologia da FCF/UNESP, **Elisabete Z. P. Lepera** e **Rosana F. P. Silva**, pela amizade, prontidão e competência em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de toxicologia **Sandra Maria Sanches da Vinha de Lorenzo** e **Maria Aparecida dos Santos Francisco**, pela disponibilidade em auxiliar na utilização de aparelhos utilizados nas técnicas experimentais.

À minha irmã **Andriély Cristina Cornélio**, pela amizade fraterna, apoio incondicional e por tudo que fez e faz por mim.

Ao **Arnóbio**, pelo carinho, cuidado e apoio.

Às amigas de república **Cristiane, Aline, Joyce, Graziela, Maria Carolina, Priscila, Gabriela e Traudi** pela amizade, conselhos e conversas nos momentos difíceis e pelos vários momentos agradáveis de convivência.

Aos amigos do laboratório de farmacologia **Tarciso, Joyce, Eduardo, Fábio, Gabriela, Carolina, Leonardo, Karina, Janine, Kátia, Julize, Marcelo, Lucília, Laiane, Rodrigo, Roberta, Ana Paula, Ana Helena, Camila, Alessandra, Vander e a todos os outros** pela amizade e apoio essencial ao meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos da pós-graduação **Lilia, Patrícia, Richard, Daniela, Graziela, André, Lidiane, Wagner Mariano e a todos os outros** pela amizade e colaboração.

À **Minha Família** pelo carinho, respeito e apoio às minhas escolhas.

Às secretárias **Selma e Taila**, pela competência profissional na secretaria do PPG-CF.

À **Ana**, pela disponibilidade e competência nos serviços prestados na secretaria do PANT.

Aos **funcionários da biblioteca**, pela disponibilidade e apoio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº 03/05261-5)**, pelo apoio financeiro.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, pertencente ao convênio da Universidade Federal de São Carlos e da Universidade Estadual Paulista.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP** de Araraquara pelo espaço físico laboratorial, equipamentos e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

Ao **Laboratório de Comportamento Exploratório da USP de Ribeirão Preto** por ceder-nos o programa de análise de comportamento X-Plorat e assessorar-nos tecnicamente quanto ao seu uso.

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	8
<b>2. ABSTRACT</b>	9
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>3.1 Ansiedade</b>	10
<b>3.2 Ansiedade Normal e Patológica</b>	11
<b>3.3 Classificação dos Transtornos de Ansiedade</b>	14
<b>3.3.1 Transtorno de Ansiedade Generalizada</b>	16
<b>3.4 Reações de Defesa</b>	17
<b>3.5 Serotonina e Ansiedade</b>	19
<b>3.6 Hipocampo e Amígdala</b>	21
<b>3.7 Evidências clínicas e experimentais</b>	23
<b>3.8 Modelo animal</b>	25
<b>4. OBJETIVOS</b>	27
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
<b>5.1 Sujeitos</b>	28
<b>5.2 Droga</b>	28
<b>5.3 Cirurgia e microinjeção de drogas</b>	28
<b>5.4 Equipamentos e Procedimentos</b>	29
<b>5.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</b>	29
<b>5.4.2 Análise comportamental</b>	30
<b>5.4.3 Histologia</b>	31
<b>5.5 Análise dos resultados</b>	31
<b>6. RESULTADOS</b>	32
<b>6.1 Hipocampo Dorsal</b>	33
<b>6.2 Hipocampo Ventral</b>	34
<b>6.3 Complexo Amigdalóide</b>	35
<b>7. DISCUSSÃO</b>	40
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	47
<b>9. ANEXOS</b>	62

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Labirinto em cruz elevado 30
- Figura 2:** Locais de microinjeção de mCPP. **A**, Hipocampo dorsal; **B**, Hipocampo ventral; **C**, Complexo Amigdalóide. 32
- Figura 3:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,3; 1 e 3 nmoles/0,2  $\mu$ l) no HD de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) (n = 9-15). 33
- Figura 4:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,3; 1 e 3 nmoles/0,2  $\mu$ l) no HV de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) (n = 8-13). 35
- Figura 5:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) no complexo amigdalóide de camundongos sobre a frequência de entradas nos braços abertos (BA) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) (n = 8 -13). \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett. 36
- Figura 6:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) no complexo amigdalóide de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) (n = 8 -13). \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett. 37
- Figura 7:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) no complexo amigdalóide de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços fechados do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) (n = 8 -13). \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett. 38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Manifestações psíquicas da Ansiedade	12
<b>Tabela 2</b> - Manifestações somáticas da ansiedade	13
<b>Tabela 3</b> - Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV	15
<b>Tabela 4</b> - Efeitos do mCPP microinjetado no HD em comportamentos no LCE.	34
<b>Tabela 5</b> - Efeitos do mCPP microinjetado no HV em comportamentos no LCE.	35
<b>Tabela 6</b> - Efeitos do mCPP microinjetado no complexo amigdalóide sobre o comportamento de camundongos no LCE	39

## 1. RESUMO

Tem sido demonstrado que a serotonina (5HT) desempenha um papel dual nos estados de ansiedade. Dependendo do tipo de receptor e dos locais cerebrais esta monoamina pode aumentar ou diminuir a ansiedade. Existem vários estudos que demonstram que a 5HT modula a ansiedade quando interage com os receptores 5HT<sub>2</sub>. Em ratos, infusões intra-hipocampo e intra-amígdala de ligantes de receptores 5HT<sub>2</sub> resultam em efeitos inconsistentes em muitos modelos animais de ansiedade. O presente estudo investigou o efeito do agonista de receptores 5HT<sub>2B/2C</sub>, mCPP micoinjetado bilateralmente no hipocampo dorsal (HD, 0; 0,3; 1 e 3 nmoles/0,2µl), hipocampo ventral (HV, 0; 0,3; 1 e 3 nmoles/0,2µl) e complexo amigdalóide (0; 0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1µl) sobre a ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os testes foram gravados e subseqüentemente registrados para índices de ansiedade (porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos) e atividade locomotora (entradas nos braços fechados). Os resultados mostraram que microinfusões de mCPP em ambas as regiões do hipocampo não afetaram a atividade locomotora bem como não alteraram os índices de ansiedade. Todavia, quando injetado no complexo amigdalóide, esse agonista 5HT<sub>2</sub> aumentou a ansiedade na dose de 1nmol, um efeito que se mostrou seletivo, pois nenhuma dose de mCPP afetou a atividade locomotora. Nossos resultados sugerem que os receptores 5HT<sub>2B,2C</sub> localizados no complexo amigdalóide, mas não os localizados no hipocampo, estão envolvidos na ansiedade eliciada pelo LCE em camundongos.

## 2. ABSTRACT

It has been demonstrated that serotonin (5HT) plays a dual role on anxiety states. Depending on the type of 5HT receptor and cerebral sites serotonin increases or decreases anxiety. Several studies have emphasized a role of the 5HT<sub>2</sub> receptors on anxiety modulation. In rats, intra-hippocampus or intra-amygdala infusions of 5HT<sub>2</sub> receptor ligands result in inconsistent effects in many animal models of anxiety. This study investigated the effect of the 5HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist mCPP bilaterally microinjected into dorsal (DH: 0, 0.3, 1.0 or 3.0 nmol/0.2 µl) or ventral (VH: 0, 0.3, 1.0 or 3.0 nmol/0.2 µl) hippocampus and amygdaloid complex (0, 0.15, 0.5, 1.0 or 3.0 nmol/0.1 µl) in mice exposed to the elevated plus maze (EPM). Test sessions were videotaped and subsequently scored for conventional indices of anxiety (percentage of open arm entries and percentage of open arm time) and locomotor activity (closed arm entries). Results showed that mCPP microinfusions into DH or VH did not affect any behavioral measure in the EPM. However, when injected into the amygdaloid complex this 5HT<sub>2</sub> receptor agonist selectively increased anxiety at 1 nmol dose. In addition, none dose of mCPP changed locomotor activity when injected into the amygdaloid complex. Our results suggest that the 5HT<sub>2B,2C</sub> receptors located within the amygdaloid complex (but not within the hippocampus) play a role on anxiety in mice exposed to the EPM.

### **3. INTRODUÇÃO**

#### **3.1 Ansiedade**

Condição afetiva de complicada delimitação teórica, a ansiedade ou angústia é um antigo assunto de interesse do pensamento ocidental, com profundas origens tanto na tradição médica como na tradição filosófica (Pereira, 2004). Segundo Pichot (para uma revisão ver Pereira, 2004), os termos latinos correspondentes a angústia e ansiedade provêm do verbo grego *agkhô* (eu aperto, eu estreito). Deste verbo, surgem os verbos *ango* e *anxio*, que no latim significam respectivamente aperto, constrição física e tormento. Estas duas raízes deram origem aos termos “angústia” e “ansiedade” que atualmente são empregados em medicina tanto no português quanto no francês e nas línguas românicas em geral. Com relação a estes termos, a distinção entre ansiedade e angústia é feita por alguns autores, entretanto não há consenso sobre tal assunto (Graeff, 1999).

Ao contrário do que é dito pelo senso popular, a ansiedade é um fenômeno onipresente na vida do homem e não, consequência da vida moderna. Relatos de sintomas sugestivos do que hoje chamamos de ansiedade generalizada são descritos desde a Antigüidade. No entanto, de acordo com Dractu & Lader (1993), seu mérito surgiu na cultura ocidental a partir do final do século XIX.

Os transtornos de ansiedade estão entre os transtornos mais comumente observados tanto na população geral quanto nos serviços de atenção primária à saúde. Dados do Estudo Epidemiológico por Área de Captação (Epidemiologic Catchment Area – ECA) nos Estados Unidos, sugerem que aproximadamente  $\frac{3}{4}$  da população apresentam um ou mais medos irracionais, ataques súbitos de ansiedade ou nervosismo. Contudo, conforme esse estudo, a maior parte das pessoas não preenche critérios de gravidade ou prejuízo pessoal e social característico dos transtornos de ansiedade (Lima et al., 2004). Entretanto, a ansiedade é uma

das causas mais comuns que levam os pacientes a procurar assistência médica ou psiquiátrica (Hetem, 2004).

A ansiedade pode ser caracterizada como um estado emocional avaliado subjetivamente como desagradável, acompanhado por sentimento de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais (ver Nutt, 1990). Lader (1981) atribui como causa principal deste estado emocional, a antecipação de um perigo, porém com ausência de reconhecimento de uma ameaça real ou, quando existente, é considerada pelos demais como desproporcional à intensidade da emoção. Todavia, a ansiedade também pode ser considerada como um estado emocional essencial dentro do repertório afetivo humano, uma vez que um certo grau de ansiedade é necessário para o bom desempenho em tarefas de natureza motora e cognitiva. Desta forma, ela é vista como um fenômeno de claro valor adaptativo. Charles Darwin, em sua obra, “A expressão das emoções no homem e nos animais”, publicada pela primeira vez em 1872, apontou o caminho, seguido em nosso século pela Etologia, de buscar o valor adaptativo dos processos comportamentais e psicológicos. Dentro deste contexto, a ansiedade pode ser apontada como um sentimento responsável pela sobrevivência da espécie humana na Terra (Schmitt & Kapczinski, 2004). O medo de ataque de predadores e a antecipação mental dessa possibilidade (características da ansiedade) levaram o homem a utilizar estratégias eficientes de fuga ou enfrentamento, resultando na preservação da espécie (Schmitt & Kapczinski, 2004).

O termo ansiedade também é comumente utilizado na literatura para situações de antecipação com valor motivacional positivo. Contudo, neste caso, tal emprego é considerado por muitos especialistas como um erro (Bernik, 1999). Assim, descrever a ansiedade como gratificante parece um erro conceitual.

### **3.2 Ansiedade Normal e Patológica**

A ansiedade geralmente provoca uma combinação de manifestações psíquicas e somáticas (Tabela 1 e 2). Exatamente por causa desta ampla gama de sensações físicas é que muitos pacientes com ansiedade consultam-se inicialmente com o clínico geral ou especialista não-psiquiatra. Na década de 1980, dados obtidos com médicos que atuam nos serviços de assistência primária mostraram que a ansiedade é o problema psiquiátrico mais freqüentemente encontrado na sua prática. Quando os aspectos subjetivos de ansiedade são as queixas principais, o diagnóstico é realizado corretamente pelos clínicos gerais em 95% dos casos. Contudo, quando os pacientes enfatizam os sintomas somáticos, o índice de acerto cai pela metade (Hetem, 2004).

**Tabela 1 - Manifestações psíquicas da Ansiedade**

• Agressividade	• Apreensão
• Desejo de escapar de certas situações	• Despersonalização
• Desrealização	• Ideação suicida
• Impulsividade	• Irritabilidade
• Nervosismo	• Medo de ficar louco ou fora de si
• Medo de perder o controle	• Medo de morrer
• Pânico	• Prejuízo da atenção/ concentração
• Preocupações desnecessárias e exageradas	• Sensação de desassossego, mal estar
• Sensação de “estar no limite”	• Sensação de “estar sempre ligado”, “estimulado”
• Sensação de medo, de “estar assustado”	• Sensação de perigo iminente

Adaptada de Hetem (2004).

Os sintomas de ansiedade podem fazer parte de uma reação normal; podem ser consequência de doenças clínicas ou induzidos por alguma substância; ser epifenômeno de outro transtorno psiquiátrico ou, finalmente, ser a manifestação de algum transtorno de ansiedade (Hetem, 2004). Dentro deste conceito, cabe ressaltar que é consensual na psiquiatria aceitar-se que em todo ser humano existe um *quantum* de ansiedade considerada normal e com função adaptativa. Além disso, uma coisa parece certa: a hipotética ausência de ansiedade constitui prova maior de doença que a constatação de saúde. O medo e a ansiedade

**Tabela 2 - Manifestações somáticas da ansiedade**

Cardiovasculares	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca/ pulso</li> <li>- Palpitações</li> <li>- Extra-sístoles</li> <li>- Dor/ desconforto torácico</li> </ul>
Gastrointestinais	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Boca seca</li> <li>- Dificuldade de deglutição</li> <li>- Náuseas e vômitos</li> <li>- Diarréia</li> <li>- Alterações do apetite</li> <li>- Desconforto epigástrico</li> <li>- Sensação de “bola na garganta”</li> </ul>
Geniturinários	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento do número de micções</li> <li>- Hesitação e/ ou urgência miccional</li> <li>- Amenorréia</li> </ul>
Otoneurológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dor de cabeça</li> <li>- Tonturas</li> <li>- Tremor</li> <li>- Hiper-reflexia</li> <li>- Parestesias (adormecimento ou formigamento)</li> <li>- Sensação de instabilidade</li> <li>- Reflexo de sobressalto exagerado</li> <li>- Midríase/ Visão borrada</li> <li>- Zumbido no ouvido</li> </ul>
Perturbações do sono	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insônia de conciliação</li> <li>- Sono entrecortado e/ou pouco repousante</li> </ul>
Respiratórios	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensação de falta de ar/ sufocamento</li> <li>- Aumento da frequência respiratória</li> <li>- Encurtamento dos movimentos respiratórios</li> </ul>
Sexuais	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuição da libido</li> <li>- Impotência</li> <li>- Ejaculação precoce</li> <li>- Dispareunia</li> <li>- Frigidez</li> </ul>
Tensão motora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tremor</li> <li>- Fasciculações</li> <li>- Tensão muscular</li> <li>- Inquietação</li> <li>- Dor muscular</li> <li>- Sensação de fraqueza</li> </ul>
Vasomotores	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extremidades frias</li> <li>- Calafrios e/ou ondas de calor</li> <li>- Rubor</li> <li>- Sudorese</li> <li>- Palidez</li> </ul>

Adaptada de Hetem (2004).

têm valor adaptativo, na medida em que levam o indivíduo a evitar dano físico ou psicológico.

Estudos clássicos mostraram que há relação direta entre nível de ansiedade e eficiência na

execução de tarefas intelectuais. Todavia, a partir de certa intensidade, o aumento na ansiedade não produz mais melhora no desempenho. Desta forma, quando a ansiedade alcança níveis muito elevados o desempenho fica prejudicado (Graeff, 1999).

Quando o nível de ansiedade ultrapassa determinado limiar, que varia de pessoa para pessoa, esse passa a ser considerado patológico, condição em que o quadro é denominado Transtorno de Ansiedade (primário ou secundário). Nem sempre é fácil a diferenciação entre a ansiedade normal e aquela patológica. A distinção fundamenta-se na intensidade das manifestações, na duração, na proporcionalidade da relação entre o evento desencadeante e a reação de ansiedade, e no grau de limitação provocado. Quando a ansiedade é intensa, persistente, desproporcional às possíveis causas aparentes e interfere de maneira considerável no funcionamento global do indivíduo, deve ser considerada doença e alvo de intervenção médica (Hetem, 2004).

Ainda é importante ressaltar, que a ansiedade patológica pode ser caracterizada como manifestação principal do quadro clínico, sendo denominada de ansiedade primária. Contudo, em algumas situações, a ansiedade pode ocorrer como conseqüências secundárias de outras enfermidades de natureza psiquiátricas ou não. Trata-se neste caso de ansiedade secundária, tendendo a desaparecer conforme a doença que lhe deu origem for tratada (Graeff, 1999).

### **3.3 Classificação dos Transtornos de Ansiedade**

A classificação dos transtornos de ansiedade surge tardiamente dentro da história das classificações de transtornos mentais em decorrência de dois motivos: 1. Não eram aceitos como entidades clínicas distintas e 2. as primeiras classificações oficiais de que se tem notícias se destinavam basicamente a documentar pacientes internados em instituições psiquiátricas, onde, os sintomas ansiosos, quando descritos, eram relacionados à depressão grave (ver Figueiredo, 2004).

As discrepâncias de conceitos e diagnósticos dos transtornos de ansiedade entre os profissionais da área de psiquiatria, ainda que em épocas mais recentes, foram fatores que dificultaram o avanço das investigações científicas, uma vez que os estados de ansiedade eram reconhecidos sob diferentes nomes conforme a prevalência do quadro sintomatológico e o suposto mecanismo subjacente, sem a existência de um consenso geral sobre o assunto.

Dentro deste contexto, alguns critérios operacionais foram adotados pela Organização Mundial de Saúde através do Código Internacional das Doenças (CID), bem como pela Associação Psiquiátrica Norte Americana, através dos Manuais de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (DSM, do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), com o intuito de tornar as classificações dos distúrbios de ansiedade mais claras e reduzir o desacordo entre profissionais de saúde mental. A Tabela 3 mostra a classificação dos transtornos de ansiedade, de acordo com a última revisão e atualização do DSM publicada em 1994, o DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994).

**Tabela 3 - Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV**

Transtorno do Pânico com Agorafobia  
 Transtorno do Pânico sem Agorafobia  
 Agorafobia sem história de Transtorno de Pânico  
 Fobia Social  
 Fobia Específica  
 Transtorno Obsessivo – Compulsivo  
 Transtorno de Estresse Pós – Traumático  
 Transtorno de Estresse Agudo  
 Transtorno de Ansiedade Generalizada  
 Transtorno de Ansiedade devido a uma condição médica geral  
 Transtorno de Ansiedade induzida por substância  
 Transtorno de Ansiedade sem outra especificação (SOE)

---

Adaptada de Hetem (2004).

Segundo a classificação do DSM-IV, a ansiedade como característica principal de um quadro clínico não é mais entendida como fenômeno unitário, podendo ser subdividida em diferentes subtipos. Todavia, este trabalho focará apenas na definição do transtorno de ansiedade generalizada.

### **3.3.1 Transtorno de Ansiedade Generalizada**

Segundo DSM-IV, o transtorno de ansiedade generalizada é uma condição caracterizada por ansiedade e preocupação excessiva, ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses, acompanhada por pelo menos três sintomas adicionais tais como inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e distúrbio do sono.

O diagnóstico exclui aspectos característicos de outros distúrbios de ansiedade, como por exemplo, preocupação com possíveis ataques de pânico (como no transtorno de pânico), de estar contaminado (como no transtorno obsessivo–compulsivo), de ganhar peso (como na anorexia) e de sentir-se embaraçado frente a situações de evidência (como na fobia social). O DSM-IV salienta que o quadro não pode ser consequência direta dos efeitos fisiológicos de uma droga ou medicamento, de uma doença somática (como hipertireoidismo) ou de um distúrbio psiquiátrico (como depressão ou esquizofrenia).

Numa visão evolutiva, o transtorno aqui focado e outros tais como o transtorno obsessivo-compulsivo, são vistos como patologias do sistema de defesa humano, e, desta forma, a investigação das reações de defesa através de ensaios em vários mamíferos (como, por exemplo, os roedores) torna-se de extrema relevância para a compreensão dos seus mecanismos neurobiológicos subjacentes (Gray & McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2001; Graeff & Zangrossi, 2002).

### 3.4 Reações de Defesa

O estudo sistemático da ansiedade e do medo tomou impulso a partir dos trabalhos de Charles Darwin publicados no livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* 1872 (Darwin, 1872 *apud* Zangrossi & Graeff, 2004)<sup>1</sup>. A partir desta abordagem, o homem, tendo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes suas emoções básicas. Desta forma, na mente humana estaria embutida a herança de seu passado primitivo, possibilitando que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais pudessem ser traçadas (Zangrossi & Graeff, 2004).

Conforme esta abordagem, as raízes da ansiedade e do medo estão nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem estar ou à integridade física das diferentes espécies. Considerando-se a relevância de variações intra e interespecíficas, o perigo ou ameaça para os animais podem ser representados, como por exemplo, por predadores ou estímulos associados a estes, por estímulos ambientais (altura, iluminação), por alterações no ambiente natural dos animais (tempestades, incêndios, exposição a lugares novos), por estímulos nociceptivos (choques elétricos), ou pelo ataque ou confronto com animais da mesma espécie (Zangrossi & Graeff, 2004). A escolha de uma determinada estratégia leva em conta vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou ambiente.

Neste contexto, Robert e Caroline Blanchard, avaliando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard et al., 1997), classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça, se potencial ou real (se real, distal ou proximal). No primeiro nível, as estratégias observadas foram comportamentos

---

<sup>1</sup> DARWIN, C. R. The expression of emotions in man and animals. London: John Murray, 1872.

exploratórios cautelosos e hesitantes, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Já no segundo nível, foi observada fuga ou imobilidade (estímulo distal), e no caso em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal os comportamentos observados foram fuga ou luta defensiva.

Tentando distinguir os comportamentos relacionados com ansiedade e medo, alguns autores sugerem que quando o estímulo ou a situação ameaçadora é real, os comportamentos desencadeados (fuga e luta) representariam medo, enquanto os que representam ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras (Blanchard et al., 1993). Gray & McNaughton (2000) incrementaram essa análise etoexperimental com componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade. Tais autores também enfatizam a importância da existência de conflitos esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e ansiedade. Desta forma, quando a situação permite aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação, os comportamentos observados (inibição comportamental e avaliação de risco) estariam relacionados à ansiedade. Entretanto, quando a situação permite somente as estratégias de defesa tais como esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados com o medo.

Assim, é importante salientar que as respostas comportamentais de defesa que os animais (principalmente roedores) exibem frente a estímulos ameaçadores e sua previsibilidade farmacológica são as bases dos modelos animais existentes utilizados atualmente como ferramentas para investigação de novos fármacos e dos mecanismos neurais subjacentes aos transtornos de ansiedade (ver Blanchard et al., 2001; Graeff & Zangrossi, 2002).

Dentro deste contexto, muitos estudos com modelos animais têm sido realizados com o objetivo de investigar os mecanismos neurais subjacentes aos transtornos de ansiedade relacionados à serotonina, visto que, ainda não há um consenso definindo se este neurotransmissor aumenta ou diminui a ansiedade. Embora saiba-se que este neurotransmissor está envolvido na regulação de tal transtorno (Graeff et al., 1997).

### **3.5 Serotonina e Ansiedade**

A Serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma molécula sinalizadora evolutivamente antiga que desempenha um grande número de funções em muitas espécies animais e vários tecidos (Whitaker-Azmitia, 1991; Turlejski, 1996). No sistema nervoso central, este neurotransmissor desempenha um papel modulador na regulação de muitas funções cerebrais tais como termorregulação (Feldberg & Myers, 1964), sono (Jouvet, 1967), agressão (Sheard, 1969) e alimentação (Lucki, 1992). O desequilíbrio na sinalização serotoninérgica é um mecanismo importante em estados psicopatológicos tais como depressão (Pinder & Wieringa, 1993), distúrbios alimentares (Leibowitz & Shor-Posner, 1986) e ansiedade (Chopin & Briley, 1987). Dentro deste contexto, a interação entre mecanismos serotoninérgicos centrais e ansiedade foi sugerida em estudos neuroquímicos, farmacológicos e eletrofisiológicos realizados nos anos 60 e 70. Entretanto, sua natureza precisa não foi esclarecida devido a uma série de resultados inconsistentes (Iversen, 1984; Gardner, 1986; Chopin & Briley, 1987; Handley, 1995; Griebel, 1995). Grande parte dessas inconsistências se deve à ocorrência de multiplicidade de subtipos de receptores serotoninérgicos e à relativa inespecificidade das ferramentas farmacológicas disponíveis. Contudo, apesar das tentativas (receptores “D” e “M”; Gaddum & Picarelli, 1957), um quadro de complexidade de sistemas de receptores serotoninérgicos surgiu somente no final dos anos 70 e início dos 80 (Peroutka & Snyder, 1979).

Em 1986, a farmacologia da serotonina foi revisada (Bradley et al., 1986) e a existência de três famílias de receptores de serotonina, 5HT<sub>1-3</sub> (compreendendo cinco receptores no total) foi confirmada embora houvesse suspeita de um maior número de receptores. Neste tempo a função de subtipos de receptores de serotonina individuais no cérebro estava basicamente indefinida. Treze anos após esta classificação a utilização de técnicas de biologia molecular tem permitido a descoberta de muitos receptores de serotonina adicionais (Barnes & Sharp, 1999). Atualmente, os receptores para serotonina são divididos em 7 grupos (de 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>), sendo que alguns destes apresentam subtipos (Hoyer et al., 1994; Hoyer & Martin, 1996). O desenvolvimento de ligantes seletivos para muitos desses subgrupos de receptores tem contribuído para o aumento do número de pesquisas sobre a serotonina e ansiedade. Muitos estudos têm priorizado o envolvimento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Goldberg & Finnerty, 1979), 5-HT<sub>2</sub> (exemplo, Kennett et al., 1994), 5-HT<sub>3</sub> (Costall & Naylor, 1991) e 5-HT<sub>4</sub> (Kennett et al., 1997) nos mecanismos de ansiedade. Devido ao seu envolvimento com prováveis sítios de drogas usadas no tratamento de várias desordens como enxaqueca, esquizofrenia, depressão e ansiedade, particular interesse tem sido dedicado aos receptores 5-HT<sub>2</sub> centrais (Baxter et al., 1995).

A família dos receptores 5-HT<sub>2</sub> compreende três subtipos de receptores pós-sinápticos acoplados a proteína G, designados como 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> (Hoyer et al., 1994; Barnes & Sharp, 1999). Esses receptores foram agrupados inicialmente de acordo com suas estruturas primárias (Foguet et al., 1992; Roth et al., 1998), funções sistêmicas secundárias (Berg et al., 1994; Berg et al., 1998) e ações farmacológicas (Hoyer et al., 1994; Baxter et al., 1995; Barnes & Sharp, 1999). Embora existam diferenças regionais na distribuição dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, todos eles estão presentes no cérebro (Nic Dhonnchadha et al., 2003). Por exemplo, têm sido identificadas altas quantidades de receptores 5-HT<sub>2A</sub> no córtex frontal, gânglios da base e, menores níveis em alguns componentes do sistema límbico,

como hipocampo, septo e amígdala (Zifa & Fillion, 1992; Hoyer et al., 1994; Pompeiano et al., 1994). A maior expressão de receptores 5-HT<sub>2C</sub> está presente no plexo coróide, seguida por substancial densidade em outras regiões como o núcleo septal lateral, núcleo subtalâmico, amígdala e partes do hipocampo, substância negra, matéria cinzenta periaquedutal e cerebelo (Pazos et al., 1985; Zifa & Fillion, 1992; Hoyer et al., 1994; Abramowski et al., 1995; Wright et al., 1995; Sharma et al., 1997). Os receptores 5-HT<sub>2B</sub> estão concentrados no hipocampo, córtex, mesencéfalo e hipotálamo (Bonhaus et al., 1995), embora Duxon et al. (1995; 1997) tenham localizado proteínas receptoras 5-HT<sub>2B</sub> principalmente na amígdala lateral e septo lateral de ratos.

Nic Dhonnchadha et al. (2003) sugeriram que devido ao padrão de distribuição cerebral dos receptores 5-HT<sub>2</sub> (principalmente dos subtipos 2B e 2C) sua ativação pode estar envolvida na regulação de transtornos do humor e da ansiedade.

### **3.6 Hipocampo e Amígdala**

A formação hipocampal é constituída por estruturas subcorticais sendo citoarquiteticamente dividida em quatro áreas: giro denteado, hipocampo (ou corno ammonis, dividida em áreas CA1, CA2 e CA3), complexo subicular (subiculum, pre-subiculum e para-subiculum) e o córtex entorrinal (Djavadian, 2004). Petrovich et al. (2001) dividem o hipocampo em termos de conexão aferente em cinco zonas, sendo que a Zona 1 circunda a metade dorsal de CA1 e as Zonas 2-5 a metade ventral de CA1 e subiculum. Conexões hipocampais para estruturas subcorticais tais como amígdala, hipotálamo e núcleo acumbente estão restritas, em sua maior parte, aos dois terços ventrais do hipocampo (Canteras & Swanson, 1992; Petrovitch et al., 2001). Já a entrada sensorial proveniente dos córtices de associação, entorrinal e perirrinal terminam primariamente no hipocampo dorsal (HD) (Ruth et al., 1982; Witter & Groenewegen, 1984; Amaral & Witter, 1989), enquanto a

densidade de terminais monoaminérgicos e colinérgicos é mais alta no hipocampo ventral (HV) em relação ao HD (Gage & Thompson, 1980; Verney et al., 1985; Hortnagl et al., 1991). Entretanto, a inervação serotoninérgica da formação hipocampal é densa e altamente organizada (Moore & Halaris, 1975; Tork, 1985). Conforme Mc Naughton & Corr (2004), o envolvimento do hipocampo na ansiedade se justificaria pelo fato de tal estrutura participar na resolução de conflitos que são eliciados tanto cognitiva como emocionalmente.

A amígdala, identificada por Burdach (para revisão veja Sah et al., 2003) no início do século XIX, é uma estrutura em forma de amêndoa localizada profundamente no lobo temporal. 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 amigdalóide (Sah et al., 2003). O complexo amigdalóide compreende 13 núcleos, com amplas conexões internucleares e intranucleares. Estes núcleos e subnúcleos são classificados com base na organização citoarquitetônica, histoquímica e conexões realizadas (Krettek & Price, 1978; Pitkänen, 1994). Conforme a nomenclatura utilizada por Price et al (1987), com algumas modificações realizadas por McDonald (1998), os núcleos da amígdala 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 separado que não pode ser classificado em um desses três grupos e que envolve as massas celulares intercaladas e a área amigdalohipocampal.

Dentro deste contexto, postula-se que a amígdala funcione como interface entre os sistemas sensoriais, que conduzem a informação sobre os estímulos condicionado e incondicionado até seus núcleos lateral e basolateral, e as regiões subcorticais, que controlam

a expressão das respostas condicionadas motoras e autonômicas . O núcleo central parece ser a via de saída da informação processada na amígdala, e suas diferentes projeções eferentes parecem mediar componentes distintos da reação de medo (LeDoux et al., 1988; LeDoux et al., 1990). Entretanto, LeDoux (1994) concentra o papel da amígdala na defesa assim como ele trata o papel do hipocampo como equivalente àquele de áreas perceptivas e associativas de neocórtex, ignorando seu envolvimento em comportamentos inatos, sua relação à ação ansiolítica e os efeitos de ansiolíticos sobre seu funcionamento.

Assim, McNaughton & Corr (2004) propõem que, em situações de ansiedade, a amígdala é uma estrutura alvo de estímulos ameaçadores e o local onde o sistema septo-hipocampal age para aumentar o valor emocional de tais estímulos elevando assim, a inibição comportamental. Dentro desta perspectiva, Graeff (2004) sugere que a serotonina aumenta a ansiedade na amígdala por agir em receptores de ambos os tipos 5HT<sub>1</sub> e 5HT<sub>2</sub>.

### **3.7 Evidências clínicas e experimentais**

Estudos clínicos usando antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> apresentaram evidências sugestivas para o seu uso no tratamento de transtornos de ansiedade e fobias, podendo, porém, exacerbar o pânico (Griebel, 1995). De modo semelhante, estudos recentes têm demonstrado que antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> possuem propriedades ansiolíticas tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos (Connell et al., 1995; Zangrossi et al., 2001). Efeitos ansiolíticos também foram demonstrados em experimentos com dois antagonistas 5-HT<sub>2B/2C</sub>, SB 200646A e SDZ Ser 082, sobre a esquiva inibitória em ratos no labirinto em T elevado (Mora et al., 1997; Graeff et al., 1998). Entretanto, tem sido relatado que antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> não alteram os comportamentos defensivos na bateria de testes de defesa para camundongos (Blanchard et al., 1998a). Já no modelo de transição claro/escuro para camundongos (Crawley & Goodwing, 1980), resultados com antagonistas não seletivos 5-HT<sub>2</sub>

são variáveis, uma vez que efeitos ansiolíticos, ansiogênicos e ausência de efeitos foram relatados (Barnes et al., 1992; Gao & Cutler, 1993; Costall & Naylor, 1995).

Por outro lado, estudos pré-clínicos e clínicos demonstram evidências de efeitos ansiogênicos de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (Griebel, 1995). Em animais, a administração sistêmica de agonistas 5-HT<sub>2B/2C</sub> provoca efeitos ansiogênicos (Carvalho-Netto & Nunes-de-Souza, 2004). Tais efeitos são encontrados no labirinto em T elevado para ratos e no modelo de transição claro/escuro para camundongos, nos quais o mCPP, produziu, respectivamente, efeito pró-aversivo na esquivada (Graeff et al., 1998) e diminuiu a exploração do compartimento iluminado (Griebel et al., 1991).

Com base nos resultados revisados por Graeff (2002), há evidências que a serotonina facilita ansiedade por agir em estruturas prosencefálicas tais como o sistema septo-hipocampal e amígdala. Neste sentido vários estudos têm sido feitos com o propósito de identificar o papel dos receptores 5-HT<sub>2</sub> centrais na modulação da ansiedade. Assim, a administração de mCPP no hipocampo dorsal (HD) reduziu a interação social em ratos na condição de baixa claridade/familiaridade (Whitton & Curzon, 1990), sugerindo um efeito ansiogênico específico, já que não houve mudanças concomitantes na atividade locomotora geral. Além disso, a administração sistêmica de mCPP também demonstra ser ansiogênica em seres humanos (Mueller et al., 1985; Charney et al., 1987).

Diferente do demonstrado no hipocampo, infusões de outro agonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>, o BW 723C86, na amígdala medial aumentou significativamente a interação social de ratos (Duxon et al., 1997), um efeito que foi bloqueado pelo antagonista SB200646A. Como ambos, agonista e antagonista, apresentam maior afinidade pelos receptores 5-HT<sub>2B</sub> comparado aos 5-HT<sub>2C</sub>, Duxon et al. (1997) sugeriram que os efeitos ansiolíticos do BW 723C86 poderiam ser devidos a sua ação nos receptores 5-HT<sub>2B</sub>. Esses mesmos investigadores demonstraram que a microinjeção de BW723C86 na amígdala medial provocou efeitos

ansiolíticos e não alterou a ansiedade em animais expostos aos testes do labirinto em cruz elevado e de beber punido de Vogel, respectivamente. De modo interessante, a metisergida, um antagonista não seletivo de receptores 5-HT<sub>2</sub>, produziu efeitos anti-conflito quando injetada no núcleo basolateral da amígdala (Hodges et al., 1987). Tais resultados sugerem que o sítio de injeção e o subtipo de receptor da serotonina são importantes para a compreensão dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de compostos farmacológicos. Assim, o desenvolvimento de novos compostos com diferentes afinidades para os diversos subtipos de receptores 5-HT<sub>2</sub> tem sido de interesse para possíveis propostas terapêuticas (Nic Dhonnchadha; 2003).

### **3.8 Modelo animal**

Um outro aspecto é o fato de que vários estudos têm demonstrado que a inconsistência de efeitos de drogas sobre a ansiedade pode estar relacionada ao modelo animal utilizado (Handley & McBlane, 1993; Hoyer et al., 1994; Griebel, 1995; Griebel, 1996; Rodgers et al., 1997; Martin et al., 1998). Dentre os principais testes de ansiedade em animais, o labirinto em cruz elevado tem sido o mais utilizado desde sua introdução, há mais de duas décadas. O teste do labirinto em cruz elevado (LCE), validado em ratos (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985) e em camundongos (Stephens et al., 1986; Lister, 1987), é baseado na aversão natural dos roedores a espaços abertos e abrange o estudo dos padrões exploratórios em um labirinto simples, compreendendo quatro braços, dos quais dois têm paredes (braços fechados) e dois não (braços abertos). Dentro deste contexto, há consenso que este tipo de teste envolve situações ou estímulos que são etologicamente relevantes ao animal. O fato de que tal teste compreende a exploração espontânea do ambiente pelos roedores, na ausência de recompensa explícita ou de comportamentos consumatórios, contribui para sua classificação como um modelo etológico (Carobrez e Bertoglio, 2005). Assim, os níveis de ansiedade no LCE são

avaliados pela esquivagem aos braços abertos (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), ao passo que a atividade geral é avaliada pela frequência absoluta de entrada nos braços fechados (exemplos, Lister, 1987; File, 1992; Cruz et al., 1994; Rodgers & Johnson, 1995).

Recentemente, Canto-de-Souza et al. (2002) relataram efeitos ansiolíticos com infusões intra-NMR (núcleo mediano da rafe) de WAY-100635, um antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, em camundongos expostos ao LCE. Segundo esses autores, tais efeitos poderiam estar associados ao aumento de disparos de neurônios serotoninérgicos (via bloqueio da ação da 5-HT nos autorreceptores inibitórios do tipo 5-HT<sub>1A</sub>), levando a atenuação da ansiedade pela 5-HT em sítios pós-sinápticos (exemplos, amígdala, hipocampo, matéria cinzenta periaquedutal). Evidências de que a atenuação da ansiedade não se deve à ação da serotonina nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados na amígdala e no hipocampo ventral (HV) são encontradas em estudos com injeções locais de 8-OH-DPAT e WAY-100635, agonista e antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente. Por exemplo, a microinjeção de 8-OH-DPAT na amígdala provoca efeitos ansiogênicos (Nunes-de-Souza et al., 2000), enquanto injeções de WAY-100635 no hipocampo ventral atenuam a ansiedade (Nunes-de-Souza et al., 2002) de camundongos expostos ao LCE. Assim, é possível que os efeitos ansiolíticos relatados por Canto-de-Souza et al. (2002) se devam ao aumento da liberação de serotonina em outros sítios (exemplo, nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> da matéria cinzenta periaquedutal) ou à sua ação em outros receptores serotoninérgicos (exemplos, receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> localizados na amígdala e hipocampo). Para investigar esta última possibilidade, segundo a qual os efeitos ansiolíticos relatados por Canto-de-Souza et al. (2002) poderiam estar ocorrendo devido à ação da serotonina em outros receptores serotoninérgicos, o presente estudo avaliou os efeitos da ativação dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> no paradigma do LCE em camundongos.

## 1. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da ativação dos receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub> no paradigma do LCE em camundongos. Assim, esse estudo avaliou os efeitos do mCPP, agonista dos receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub>, microinjetado bilateralmente no hipocampo dorsal e ventral e no complexo amigdalóide (sítios pós-sinápticos) sobre a ansiedade de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos albinos Suíços adultos machos (25-35g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram alojados em grupos de 10 (gaiola: 41 x 34 x 16 cm), mantidos sob o ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas: 07:00h), em um ambiente com temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 5\%$ ) controladas, por pelo menos uma semana antes dos testes. Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*, exceto durante as breves sessões de teste.

### 5.2 Droga

O mCPP (1-(3-Clorofenil)piperazina; Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA), agonista 5-HT<sub>2B/2C</sub>, foi dissolvido em salina fisiológica e injetado bilateralmente nas doses de 0; 0,3; 1 e 3 nmoles no HD e HV e 0; 0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles no complexo amigdalóide. As doses foram baseadas em estudos pilotos e em estudos prévios (Duxon et al., 1995; Eberle-Wang et al., 1996; Menard & Treit, 1999). O pH das soluções foi ajustado entre 6 e 7 com hidróxido de sódio (0,1 M NaOH).

### 5.3 Cirurgia e microinjeção de drogas

Os animais receberam implantação bilateral de cânulas-guia (26-gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltda) de 7mm de comprimento, após anestesia com tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico, através das coordenadas estereotáxicas definidas pelo Atlas de Franklin & Paxinos (1997). As coordenadas usadas para implantação das cânulas-guia no HV e HD foram, respectivamente, 2,8 e 1,8 mm posterior ao bregma,  $\pm 3,0$  e  $\pm 1,6$  mm lateral à linha média, 3,7 e 1,5 mm ventral à superfície craniana. Para o complexo amigdalóide, as cânulas-guia foram

bilateralmente implantadas seguindo as seguintes coordenadas estereotáxicas: 1,4 mm posterior ao bregma,  $\pm$  3,1 mm lateral à linha média e 3,7 mm ventral à superfície craniana. Para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação, foi inserido um estilete (mandril) nas cânulas-guia.

Após um período de 5 a 7 dias de recuperação cirúrgica, a injeção intracerebral das soluções foi realizada pela introdução de uma agulha de injeção (33-gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltda) de 8 mm de comprimento dentro de cada cânula-guia. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubos de polietileno (PE-10) a microseringas Hamilton (5 $\mu$ l). As soluções foram injetadas com auxílio de uma bomba de infusão (BI 2000, Insight Equipamentos), a qual foi programada para injetar as soluções numa razão de 0,2  $\mu$ l/60 segundos. Os volumes máximos de cada microinfusão foram de 0,2  $\mu$ l tanto para o hipocampo dorsal como para o hipocampo ventral e 0,1  $\mu$ l para complexo amigdalóide.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção dos mandris, inserção das agulhas de injeção, infusão da solução e permanência das agulhas de injeção por 60 segundos após o término das injeções enquanto o animal foi contido manualmente pelo experimentador com o uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução.

## **5.4 Equipamentos e Procedimentos**

### **5.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O LCE é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de vidro (assoalho de madeira e paredes transparentes) e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos por uma plataforma central comum (5 x 5), e elevado 38,5 cm do solo por um suporte de madeira.



**Figura 1:** Labirinto em cruz elevado

Após receberem a microinjeção de mCPP ou salina no HV, HD ou complexo amigdalóide os camundongos foram colocados por um minuto numa gaiola de espera e, em seguida, expostos ao labirinto. Cada animal foi colocado sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e explorou o labirinto por um período de 5 minutos. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala iluminada (1x 100 W).

#### **5.4.2 Análise comportamental**

Os comportamentos foram avaliados pela análise das fitas gravadas por um observador treinado usando um programa de análise etológica (X-plorat, versão 3.0) desenvolvido pelo grupo do Dr. Morato na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Os comportamentos analisados envolveram os parâmetros convencionais: frequência 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. Esses dados foram usados para o cálculo

da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas:  $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$ ; Tempo:  $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$ ).

### **5.4.3 Histologia**

Após o término dos experimentos todos os animais receberam injeção de uma solução de 1% de azul de Evans no HD, HV ou complexo amigdalóide, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Em seguida, os animais foram decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para, posteriormente, sofrerem seções coronais ao longo do trajeto da cânula com o uso de um criostato (Leica CM 1850). As seções foram inspecionadas com o uso de um estereoscópio (Carl Zeiss) e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção. Foram excluídos dos experimentos os animais cuja dispersão do azul de Evans situou-se fora das estruturas alvos (HD, HV e complexo amigdalóide).

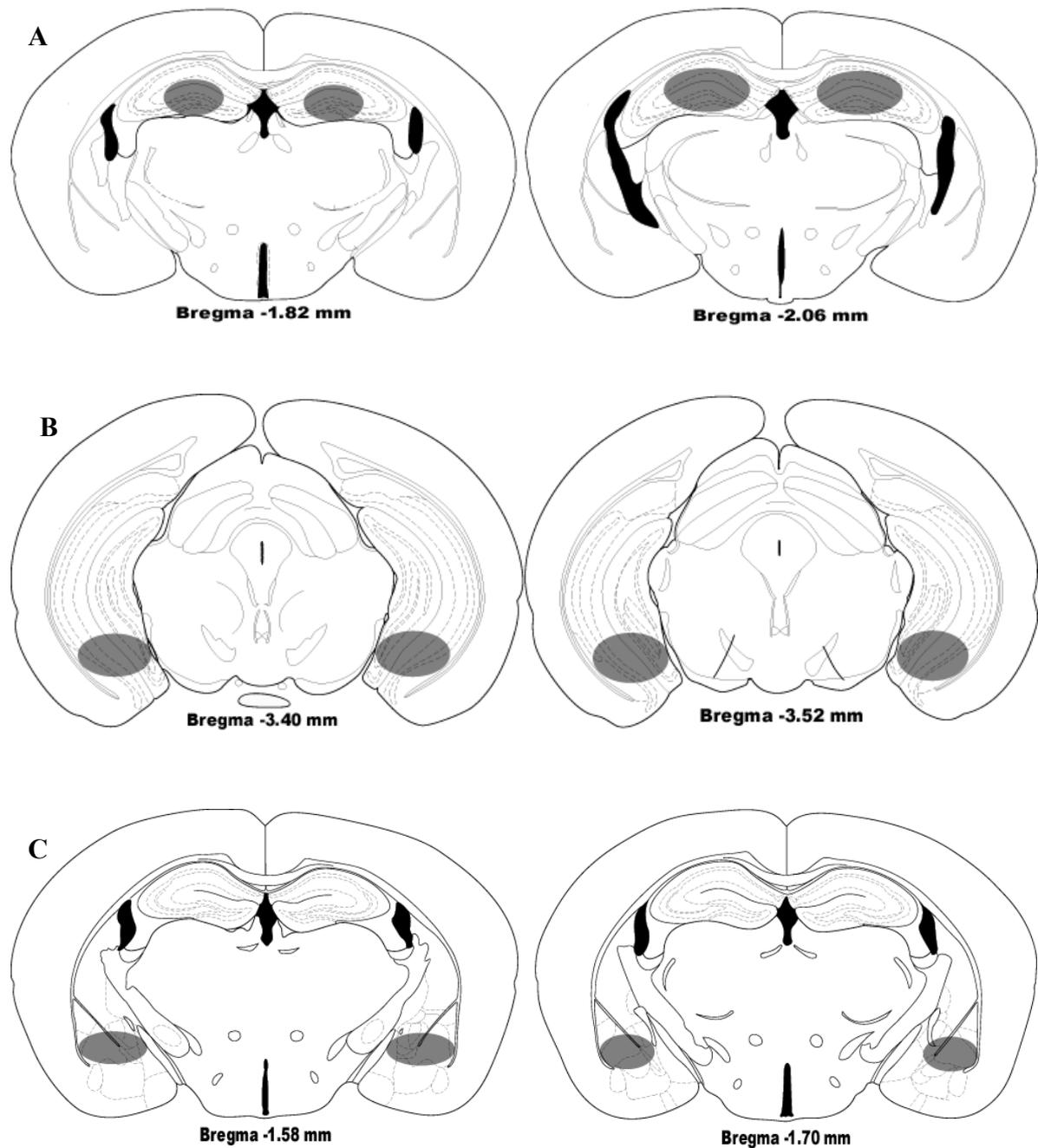
### **5.5 Análise dos resultados**

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Quando significativo, os valores foram transformados em LOG10 (variável +1) e posteriormente analisados pela análise de variância (ANOVA) de um fator (tratamento) seguida pelo teste de Dunnett. Os valores de  $p$  iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos.

### 3. RESULTADOS

A histologia confirmou um total de 49 camundongos com implantação bilateral de cânulas no HD, 42 camundongos com implantação bilateral de cânulas no HV e um total de 51 camundongos com implantação bilateral de cânulas no complexo amigdalóide (Figura 2).

A amostra final apresentou um  $n = 8-15$ .

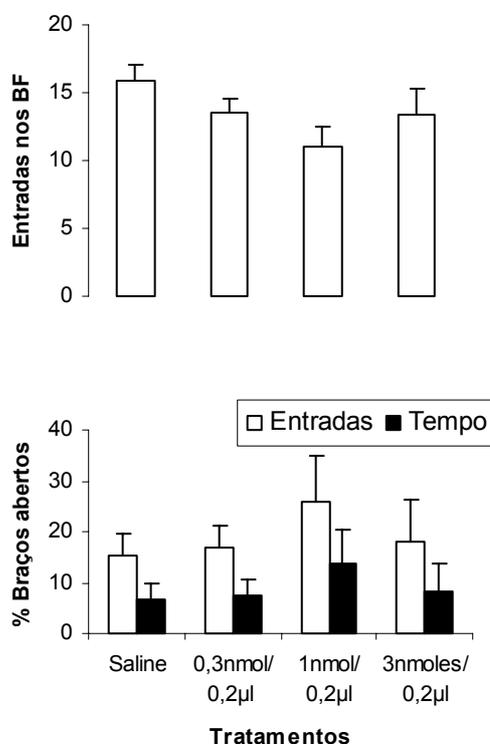


**Figura 2:** Locais de microinjeção de mCPP. **A**, Hipocampo dorsal; **B**, Hipocampo ventral; **C**, Complexo Amigdalóide.

Os resultados comportamentais estão demonstrados nas Figuras 3-5 (% de entradas e % de tempo nos braços abertos e entradas nos braços fechados) e Tabelas 4-6 (entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos, tempo nos braços fechados, % de tempo nos braços fechados, tempo no centro e % de tempo no centro).

### 6.1 Hipocampo Dorsal

Como demonstrado na Figura 2, o tratamento com microinjeções de mCPP (0,3-3 nmoles/0,2  $\mu$ l) no HD de camundongos não produziu alterações significativas na porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e frequência de entradas nos braços fechados. A ANOVA de um fator não revelou diferenças significativas do tratamento para tais medidas [% Entradas:  $F(3,45) = 0,54$ ,  $p = 0,66$ ; % Tempo:  $F(3,45) = 0,46$ ,  $p = 0,71$ ; Entradas nos braços fechados:  $F(3,45) = 2,03$ ,  $p = 0,12$ ].



**Figura 3:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,3; 1 e 3 nmoles/0,2  $\mu$ l) no HD de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) ( $n = 9-15$ ).

A tabela 4 mostra os comportamentos (frequência de entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos, tempo nos braços fechados, porcentagem de tempo nos braços fechados, tempo no centro e porcentagem de tempo no centro) registrados em camundongos tratados com salina e mCPP (0,3-3 nmoles/0,2 µl) intra-HD e expostos por 5 minutos ao LCE. A ANOVA de um fator não revelou diferenças significativas do tratamento em nenhum dos parâmetros avaliados.

**Tabela 4-** Efeitos do mCPP microinjetado no HD em comportamentos no LCE.

Comportamentos	Salina	0,3 nmol	1 nmol	3 nmoles	F (3,45)
Entradas nos BA	2,93 ± 0,77	2,93 ± 0,75	4,89 ± 2,06	3,50 ± 1,79	0,48, NS
Tempo nos BA	20,27 ± 8,61	22,27 ± 9,46	41,00 ± 20,50	24,90 ± 16,50	0,46, NS
% Entradas nos BF	84,59 ± 4,20	83,09 ± 4,22	74,02 ± 8,75	81,95 ± 8,14	0,54, NS
Tempo nos BF	136,80 ± 11,44	107,87 ± 10,18	96,44 ± 16,92	113,30 ± 14,25	1,87, NS
% Tempo nos BF	45,60 ± 3,81	35,96 ± 3,39	32,15 ± 5,64	37,77 ± 4,75	1,87, NS
Tempo no centro	142,93 ± 11,71	169,87 ± 10,43	162,56 ± 16,95	161,80 ± 13,54	0,98, NS
%Tempo no centro	47,64 ± 3,90	56,62 ± 3,48	54,19 ± 5,65	53,93 ± 4,51	0,98, NS

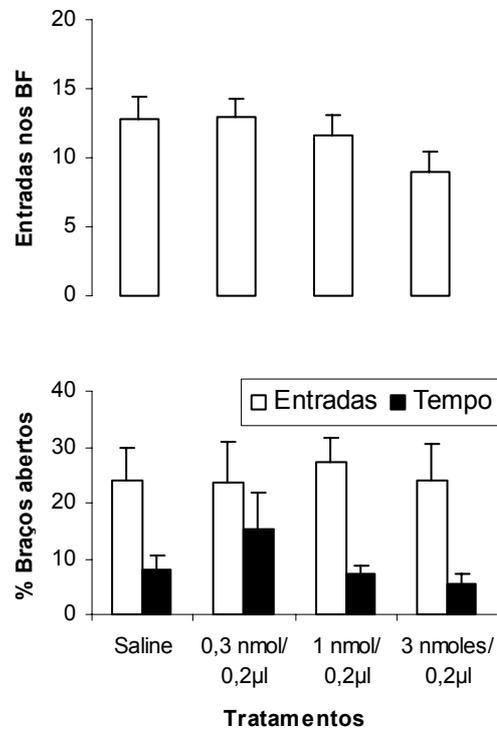
Abreviaturas: BA, braços abertos, BF, braços fechados.

## 6.2 Hipocampo Ventral

Assim como no HD, as microinjeções de mCPP no HV também não alteraram os parâmetros de ansiedade em camundongos expostos ao LCE. A Figura 4 mostra a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados do LCE de animais tratados com salina e mCPP (0,3-3 nmoles/0,2 µl) intra-HV e expostos por 5 minutos ao LCE. A ANOVA de um fator não revelou diferenças significativas para o fator tratamento [% Entradas:  $F(3,38) = 0,09$ ,  $p = 0,97$ ; %Tempo:  $F(3,38) = 0,21$ ,  $p = 0,88$ ; Entradas nos braços fechados:  $F(3,38) = 1,14$ ,  $p = 0,34$ ].

A tabela 5 mostra os comportamentos registrados em camundongos tratados com salina e mCPP (0,3-3 nmoles/0,2 µl) intra-HV e expostos por 5 minutos ao LCE. A ANOVA

de um fator não revelou diferenças significativas para o fator tratamento em nenhum dos parâmetros avaliados.



**Figura 4:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,3; 1 e 3 nmoles/0,2 µl) no HV de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) ( $n = 8-13$ ).

**Tabela 5-** Efeitos do mCPP microinjetado no HV em comportamentos no LCE.

Comportamentos	Salina	0,3 nmol	1 nmol	3 nmoles	F(3,38)
Entradas nos BA	4,36 $\pm$ 1,25	5,20 $\pm$ 1,90	4,08 $\pm$ 0,78	3,25 $\pm$ 1,04	0,34, NS
Tempo nos BA	23,82 $\pm$ 8,05	45,60 $\pm$ 20,29	21,77 $\pm$ 4,77	16,38 $\pm$ 5,39	1,23, NS
% Entradas nos BF	75,94 $\pm$ 5,65	76,38 $\pm$ 7,44	74,09 $\pm$ 4,80	75,84 $\pm$ 6,52	0,03, NS
Tempo nos BF	131,55 $\pm$ 18,72	109,60 $\pm$ 11,54	119,62 $\pm$ 14,02	107,13 $\pm$ 27,03	0,37, NS
% Tempo nos BF	43,85 $\pm$ 6,24	36,53 $\pm$ 3,85	39,87 $\pm$ 4,67	35,71 $\pm$ 9,01	0,37, NS
Tempo no centro	144,64 $\pm$ 19,34	144,80 $\pm$ 15,07	158,62 $\pm$ 15,86	176,50 $\pm$ 25,20	0,55, NS
%Tempo no centro	48,21 $\pm$ 6,45	48,27 $\pm$ 5,02	52,87 $\pm$ 5,29	58,83 $\pm$ 8,40	0,55, NS

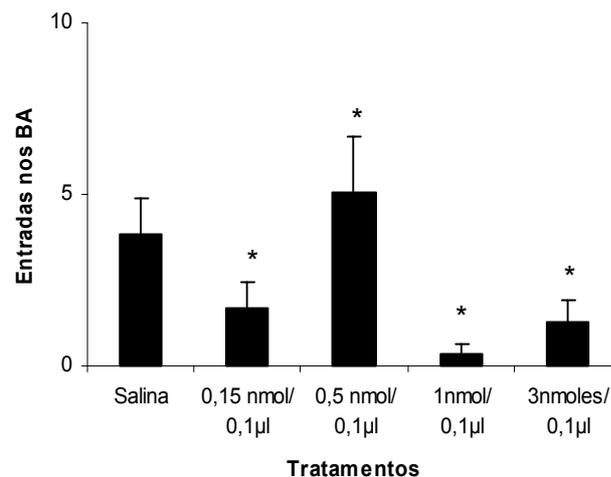
Abreviaturas: BA, braços abertos, BF, braços fechados.

### 6.3 Complexo Amigdalóide

Diferente do HD e HV, a microinjeção de mCPP no complexo amigdalóide provocou

efeitos significativos.

A Figura 5 mostra a frequência de entradas nos braços abertos do LCE de camundongos tratados com salina e mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) intra-complexo amigdalóide e expostos por 5 minutos ao LCE. A ANOVA de um fator revelou diferenças significativas para o fator tratamento sobre as entradas nos braços abertos [ $F(4,46) = 4,820702$ ;  $p = 0,002482$ ]. Comparações dos tratamentos (mCPP) com o grupo controle (Salina) demonstraram que as doses de 0,15; 1 e 3 nmoles diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) a frequência de entradas nos braços abertos do LCE. O teste de Dunnett revelou ainda que a dose de 0,5 nmol aumentou significativamente a frequência de entradas nos braços abertos do LCE.

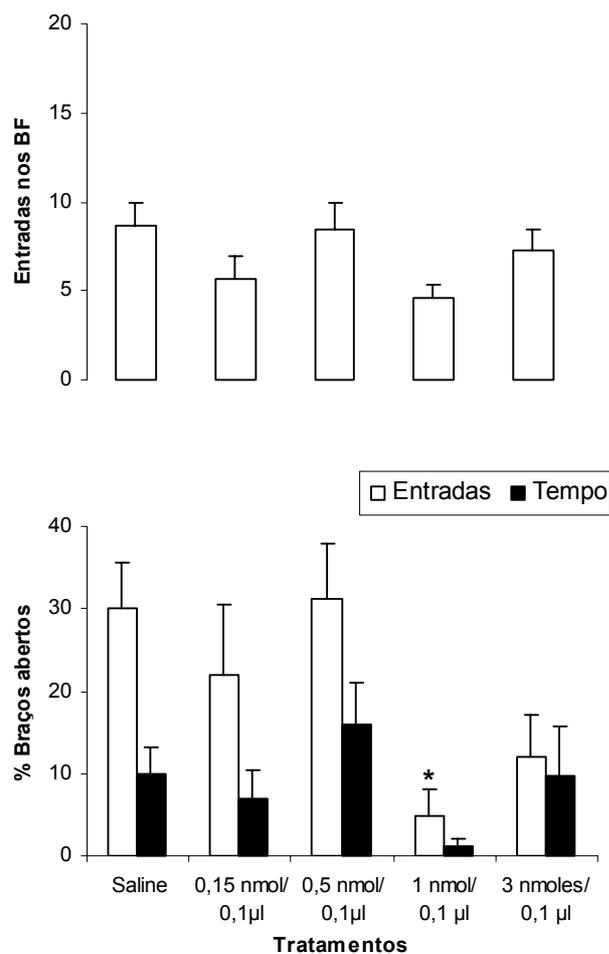


**Figura 5:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) no complexo amigdalóide de camundongos sobre a frequência de entradas nos braços abertos (BA) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) ( $n = 8 - 13$ ). \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

A Figura 6 mostra as porcentagens de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados do LCE dos animais tratados com salina e mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1  $\mu$ l) intra-complexo amigdalóide e expostos ao LCE. A ANOVA de um fator revelou diferenças significativas para o fator tratamento sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(4,46) = 3,100813$ ,  $p = 0,024271$ ] e não demonstrou diferença

significativa sobre as entradas nos braços fechados [ $F(4, 46) = 1,687676, p = 0,169064$ ] e porcentagem de tempo nos braços abertos [ $F(4,46) = 1,410375, p = 0,245519$ ]. O teste de Dunnett demonstrou que a dose de 1nmol de mCPP diminuiu significativamente a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE.

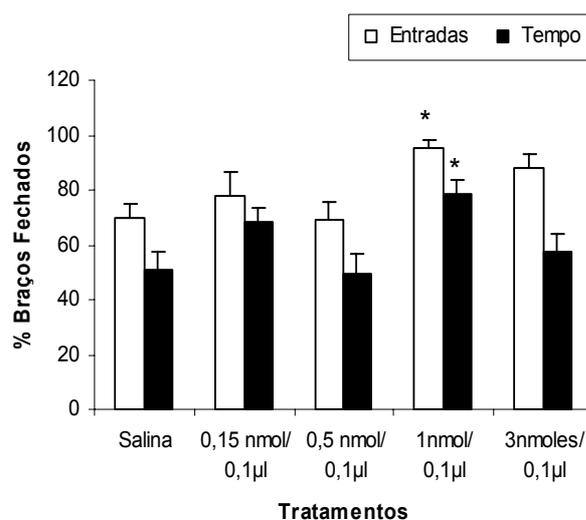
A Figura 7 mostra a porcentagem de entradas e de tempo nos braços fechados do LCE dos animais tratados com salina e mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/ 0,1  $\mu$ l) intra-complexo amigdalóide. A ANOVA de um fator revelou diferenças significativas para o fator tratamento sobre porcentagem de entradas [ $F(4,46) = 3,109924, p = 0,023971$ ] e de tempo [ $F(4,46) = 3,122266, p = 0,023571$ ] nos braços fechados.



**Figura 6:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) no complexo amigdalóide de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a freqüência de entradas nos braços fechados (BF) do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) ( $n = 8 - 13$ ). \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

A tabela 6 mostra os demais comportamentos registrados em camundongos tratados com salina e mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/ 0,1  $\mu$ l) intra-complexo amigdalóide e expostos por 5 minutos ao LCE. A ANOVA revelou diferenças significativas para o fator tratamento sobre tempo nos braços fechados [ $F(4,46) = 3,122266$ ,  $p = 0,023571$ ] e não demonstrou qualquer diferença significativa para tempo nos braços abertos [ $F(4,46) = 1,410375$ ,  $p = 0,245519$ ], tempo no centro [ $F(4,46) = 1,744085$ ,  $p = 0,156575$ ] e porcentagem de tempo no centro [ $F(4,46) = 1,744085$ ,  $p = 0,156575$ ].

O teste de Dunnett demonstrou que a dose de 1 nmol de mCPP aumentou significativamente o tempo nos braços fechados do LCE.



**Figura 7:** Efeitos da microinjeção de salina ou mCPP (0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles/0,1 $\mu$ l) no complexo amigdalóide de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços fechados do LCE. As colunas representam as médias ( $\pm$  EPM) ( $n = 8 - 13$ ). \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

**Tabela 6-** Efeitos do mCPP microinjetado no complexo amigdalóide sobre o comportamento de camundongos no LCE

Comportamentos	Salina	0,15 nmol	0,5 nmol	1nmol	3 nmoles	F (4,46)
Tempo nos BA	29,91 ± 9,65	20,56 ± 10,41	47,62 ± 15,37	3,25 ± 2,97	28,80 ± 18,18	1,41, NS
Tempo nos BF	152,82 ± 20,56	204,89 ± 15,35	147,38 ± 22,45	235,38 ± 15,07 *	171,80 ± 20,56	3,12
Tempo no centro	117,27 ± 19,78	74,56 ± 10,44	105,00 ± 15,54	61,38 ± 13,63	99,40 ± 18,61	1,74, NS
%Tempo no centro	39,09 ± 6,59	24,85 ± 3,48	35,00 ± 5,18	20,46 ± 4,54	33,13 ± 6,20	1,74, NS

Abreviaturas: BA, braços abertos, BF, braços fechados. \*  $p < 0,05$  vs salina. ANOVA seguida do teste de Dunnett.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que os receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> situados no complexo amigdalóide estão envolvidos na modulação da ansiedade eliciada em camundongos expostos ao LCE. Já no que diz respeito ao hipocampo tanto na porção dorsal quanto na porção ventral os resultados demonstram que tais receptores parecem não estar envolvidos na modulação ansiedade em animais expostos a tal teste.

Dentro deste contexto, os resultados obtidos com as microinjeções de mCPP no HD não demonstraram efeitos significativos, nas doses empregadas (0,3-3 nmoles), em relação ao grupo controle (Salina), tanto nos parâmetros de ansiedade (% de entradas e % de tempo nos braços abertos) quanto na atividade locomotora (entradas nos braços fechados) em camundongos expostos ao LCE (Fig. 3 e Tabela 4). Uma das possíveis razões para tais resultados pode ser o fato de que o HD não seja uma estrutura ativada pelas situações ameaçadoras geradas no LCE. Em apoio a esta hipótese, Kjelstrup et al. (2002) não detectaram efeitos nas medidas do LCE em ratos com lesões de HD. Contudo, como o HD é uma região cerebral que tem funções mais relevantes no controle comportamental em alguns testes animais que em outros (File et al., 2000), tem sido demonstrado que drogas microinjetadas nesta estrutura, tais como benzodiazepínicos e drogas com ação sobre o sistema serotoninérgico, produzem efeitos em testes animais de ansiedade (File et al., 2000). Por exemplo, a microinjeção no HD de 8-OH-DPAT, um agonista 5HT<sub>1A</sub>, e mCPP, agonista 5HT<sub>2B/2C</sub>, provoca efeitos ansiogênicos no teste de interação social (Whitton & Curzon, 1990; Andrews et al. 1994; File et al., 1996). Já no teste do beber punido (teste de Vogel), os agonistas 5HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT (Andrade, 1992), buspirona, ipsapirona, gepirona, tandospirona e o antagonista do receptor 5HT<sub>3</sub> ondansetron produzem efeitos ansiolíticos (Kataoka et al., 1991; Stefanski et al., 1993; Przegalinsk et al., 1994).

Algumas evidências apresentadas na literatura sugerem que o HD pode não ser importante para mediação da ansiedade em ratos inexperientes ao LCE (File et al., 2000). Por exemplo, a administração local de 8-OH-DPAT, nas doses 1 µg (Belcheva et al., 1994) ou 50-200 ng (File et al., 1996), não alterou os índices de ansiedade. Da mesma forma, Nunes-de-Souza et al. (2002) relataram que a infusão intra-HD de WAY-100635, um antagonista 5HT<sub>1A</sub>, não alterou as medidas convencionais e etológicas de ansiedade em camundongos expostos uma única vez ao LCE. Alves et al. (2004) demonstraram que microinjeções unilaterais intra-HD de TFMPP e MK-212, respectivamente, agonista não seletivo de receptor 5HT<sub>2C</sub> e agonista preferencial 5HT<sub>2C</sub>, também não revelaram qualquer efeito sobre a ansiedade em ratos expostos ao LCE. Desta forma, nossos resultados corroboram os estudos anteriores, sugerindo que os receptores 5-HT<sub>2</sub> do HD parecem não participar dos processos de mediação da ansiedade avaliada no LCE.

Quanto aos efeitos do mCPP no HV, os resultados mostraram que nenhuma das doses deste agonista 5-HT<sub>2B/2C</sub> empregadas no presente estudo (0,3, 1 e 3 nmoles) alterou significativamente os parâmetros de ansiedade (% entradas e % de tempo nos braços abertos) e a medida de atividade locomotora (entradas nos braços fechados) em camundongos expostos ao LCE (Fig. 4 e Tabela 5). Uma possível explicação para estes resultados seria o fato de que, embora o HV esteja envolvido na modulação da ansiedade como sugerido por Bannerman et al. (2004), sua participação frente à estímulos aversivos parece depender da ativação de outros receptores serotoninérgicos, que não os 5HT<sub>2B/2C</sub>. Por exemplo, Fachini et al. (2004) demonstraram efeito ansiogênico com infusão intra-HV do agonista de receptor 5HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, em camundongos expostos ao LCE. Além disso, Nunes-de-Souza et al. (2002) relataram que a infusão intra-HV de WAY-100635, um antagonista 5HT<sub>1A</sub>, aumentou a exploração dos braços abertos e reduziu avaliação de risco em camundongos no LCE. Segundo esses autores, estes efeitos foram observados sem alterações significativas na

atividade locomotora. Desta forma, talvez os receptores  $5HT_{1A}$  do HV, e não os receptores  $5HT_{2B/2C}$ , participem da modulação dos estados de ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Entretanto, recentemente Alves et al. (2004) demonstraram efeitos ansiogênicos com TFMPP e MK-212, agonista não seletivo do receptor  $5HT_{2C}$  e agonista preferencial  $5HT_{2C}$ , respectivamente, microinjetados no HV de ratos expostos ao LCE. De acordo com estes autores, a ativação dos receptores pós-sinápticos  $5HT_{2C}$  situados no HV contribui para expressão da ansiedade gerada pelo teste do LCE. Todavia, nossos resultados não confirmam o envolvimento de receptores  $5HT_{2B/2C}$  na modulação da ansiedade de camundongos neste modelo animal. Talvez, as discrepâncias entre os nossos resultados e os de Alves et al. (2004) se devam às diferenças na metodologia, uma vez que enquanto empregamos o procedimento de administração bilateral do agonista  $5HT_{2B/2C}$ , o estudo desses autores utilizou o procedimento de microinjeção unilateral. Neste sentido, Belcheva et al. (1994) demonstraram que nem a microinjeção unilateral direita ou esquerda ou ainda a microinjeção bilateral de 8-OH-DPAT, um agonista  $5HT_{1A}$ , na área CA1 hipocampal de ratos expostos ao LCE produziu efeito ansiogênico. Entretanto, injeções unilaterais deste composto provocaram ansiedade avaliada no teste de conflito de Vogel.

Assim, tais autores sugerem que há assimetria hipocampal nas respostas comportamentais evocadas pelo efeito do 8-OH-DPAT. Outro aspecto a ser considerado é a utilização de diferentes agonistas  $5HT_2$ , pois o presente estudo utilizou o mCPP para investigar o papel dos receptores  $5HT_2$  na ansiedade enquanto Alves et al. (2004) utilizaram o TFMPP e o MK212.

Além disso, existe a possibilidade de que os mecanismos serotoninérgicos envolvidos na neurobiologia das reações de defesa (no caso, o estado de ansiedade) sejam diferentes nas duas espécies - camundongos e ratos. Em apoio a esta hipótese estão estudos demonstrando que infusões de 8-OH-DPAT na amígdala não alteram o comportamento de ratos no LCE

(Gonzalez et al., 1996; Zangrossi & Graeff, 1994), mas produzem efeitos ansiogênicos em camundongos no LCE (Nunes-de-Souza et al., 2000). Da mesma forma, enquanto evidências demonstram o envolvimento de receptores  $5HT_{1A}$  do HD na ansiedade em ratos (exemplo Menard & Treit, 1998), em camundongos, seu papel na ansiedade parece ser mais relevante na porção ventral desta estrutura telencefálica (Nunes-de-Souza et al., 2002).

Diferente dos resultados obtidos no hipocampo, a infusão bilateral de mCPP na amígdala alterou significativamente as medidas de ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Curiosamente, os efeitos deste agonista  $5HT_{2B/2C}$  foram bifásicos sobre a frequência de entradas nos braços abertos do LCE. Enquanto as doses de 0,15; 1 e 3 nmoles diminuíram a frequência de exploração neste compartimento, sugerindo um efeito ansiogênico, a dose intermediária (0,5 nmol) provocou efeito oposto. O possível efeito ansiolítico, entretanto, não se confirmou quando foram avaliados os efeitos da dose de 0,5 nmol de mCPP sobre os índices convencionais de ansiedade – porcentagens de entradas e de tempo nos braços abertos. Por outro lado, o efeito ansiogênico se mostrou consistente com a dose de 1 nmol, que diminuiu a porcentagem de entradas nos braços abertos e aumentou tanto as porcentagens como os valores absolutos do tempo gasto nos braços fechados do LCE. Além disso, esta dose de mCPP também aumentou a porcentagem de entradas nos braços fechados. Na realidade, esta última medida reflete a imagem em espelho dos efeitos do mCPP sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos. Assim, é possível que o aumento da frequência de entradas nos braços abertos, obtido com a dose de 0,5 nmol, seja um efeito isolado e inconsistente, não sendo, portanto, confirmado pela avaliação dos outros parâmetros.

Um dos cuidados na interpretação de resultados obtidos com o uso do modelo do labirinto em cruz elevado diz respeito à seletividade dos efeitos de um determinado composto em estudo sobre as medidas de ansiedade. Em outras palavras, resultados ansiolíticos ou ansiogênicos podem ser falso-positivos, por exemplo, com compostos que também aumentam

e diminuem, respectivamente a locomoção dos animais expostos ao aparelho. Neste sentido, a principal medida para se avaliar a atividade locomotora no LCE é a frequência de entradas nos braços fechados (File 1992; Cruz et al. 1994; Rodgers & Johnson 1995). De modo interessante, os efeitos ansiogênicos registrados com a microinfusão bilateral de mCPP na amígdala não foram acompanhados por qualquer alteração significativa na frequência de entradas nos braços fechados. Além disso, o emprego da análise de covariância *post hoc* demonstrou que a redução das entradas nos braços abertos não covaria com as entradas nos braços fechados, indicando que o efeito do mCPP sobre a ansiedade não depende da atividade locomotora (isto é, entradas nos braços fechados). Nossos resultados indicam, portanto, um efeito ansiogênico seletivo deste agonista de receptores 5-HT<sub>2B,2C</sub> na amígdala de camundongos.

Assim, os resultados apresentados neste estudo sugerem que os receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> situados no complexo amigdalóide participam da modulação da ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Campbell & Merchant (2003) que, embora utilizando outros testes que não o LCE, demonstraram que o complexo amigdalóide está envolvido na ansiedade. Tais autores mostraram que a infusão bilateral intra-amígdala (no núcleo basolateral, mas não no núcleo central) de mCPP e também de um agonista seletivo de receptores 5HT<sub>2C</sub>, o IL639, elevou as respostas agudas de medo inato em ratos submetidos aos testes do campo aberto, latência para aproximação de um novo objeto e vocalização ultrassônica.

Entretanto, Duxon et al. (1997) demonstraram que a microinjeção de BW 723C86, um agonista de receptores 5HT<sub>2B</sub>, nos núcleos amigdalóides mediais aumentou o tempo de interação entre ratos no teste de interação social sem alterar atividade motora, indicando um efeito ansiolítico deste composto. Ainda neste mesmo estudo os autores mostraram que as ações do BW 723C86 são bloqueadas pela pré-administração de SB 200646A, um antagonista

de receptores  $5HT_{2B/2C}$ . Por conseguinte, devido ao fato de que os compostos BW 723C86 e SB 200646A apresentam maior seletividade para os receptores  $5HT_{2B}$ , quando comparados aos receptores  $5HT_{2C}$ , os autores sugerem que este efeito ansiolítico pode ser mediado pelos receptores  $5HT_{2B}$ . Com base nessas evidências, é possível que os resultados ansiogênicos aqui apresentados se devam à ação do mCPP predominantemente em receptores  $5HT_{2C}$ . Se assim, os receptores  $5HT_{2B}$  da amígdala teriam menor participação na modulação da ansiedade. Entretanto, esta hipótese encontra alguns obstáculos. Por exemplo, é também possível que esse efeito ansiolítico relatado por Duxon et al. (1997) se deva ao local (núcleos mediais) onde a microinjeção foi realizada. Neste sentido, a amígdala é definida por McNaughton & Corr (2004) como uma coleção de estruturas distintas e não como uma entidade unitária com várias partes. Segundo McNaughton & Corr (2004), algumas partes da amígdala são funcionalmente distintas de outras (particularmente, no que diz respeito ao seu envolvimento na ação ansiolítica). Portanto, talvez as diferenças entre os resultados apresentados por Duxon et al. (1997) e os mostrados neste estudo possam ser atribuídas às diferenças no local de microinfusão na amígdala. Enquanto Duxon et al. (1997) realizaram a microinfusão de BW 723C86 nos núcleos mediais da amígdala, no presente trabalho a microinjeção de mCPP foi realizada no complexo amigdalóide, ou seja, na amígdala como um todo sem visar algum núcleo específico.

Em outro estudo, Duxon et al. (1995) demonstraram efeitos ansiolíticos com injeção intra-amígdala medial de BW 726C86 em ratos expostos ao LCE. Em apoio a estes achados, Zangrossi & Graeff (1994) demonstraram um efeito ansiogênico com a microinjeção bilateral intra-amígdala nos núcleos basolateral/medial do antagonista  $5HT_2$ , cetanserina, em ratos expostos ao LCE. Outro achado interessante é que a metisergida, um antagonista  $5HT_2$ , produziu um efeito anticonflito seletivo quando infundida na amígdala basolateral (para uma revisão, ver Menard e Treit, 1999). Desta maneira, tais resultados sugerem que a manipulação

farmacológica de receptores 5-HT<sub>2</sub> pode resultar em efeitos opostos sobre a ansiedade dependendo do sítio (núcleo) amigdalóide estudado.

Curiosamente, em nosso estudo, a dose de 3 nmol de mCPP não provocou efeitos nos índices convencionais de ansiedade (porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos) quando microinjetada no complexo amigdalóide de camundongos expostos ao LCE. Talvez essa ausência de efeito seja devida a falta de seletividade do fármaco para subtipos de receptores serotoninérgicos. Todavia, conforme Millan (2003), as ações ansiogênicas do mCPP e agonistas preferenciais do receptor 5HT<sub>2C</sub>, tais como Ro60.0175, geralmente têm sido relatadas para testes baseados em respostas comportamentais espontâneas. A ausência de efeitos ansiogênicos, por sua vez, pode estar associada às ações desses compostos em outros tipos de receptores (sobretudo, receptores 5HT<sub>2B</sub>) bem como as suas propriedades sedativas mediadas via receptores 5HT<sub>2C</sub>.

Em suma, nossos achados sugerem que os receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> do complexo amigdalóide, mas não os do hipocampo, estão envolvidos na modulação da ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Entretanto, faz-se necessária a realização de experimentos adicionais, com a utilização de ferramentas farmacológicas mais específicas, para a elucidação de locais (núcleos amigdalóides) e subtipos de receptores 5HT<sub>2</sub> da amígdala com o propósito de compreender a neurobiologia da ansiedade eliciada em camundongos expostos ao LCE.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOWSKI, D.; RIGO, M.; DUC, D.; HOYER, D.; STAUFENBIEL, M. Localisation of the 5-Hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor protein in human and rat brain using specific antisera. **Neuropharmacology**, v.34, p.1635-1645, 1995.

ALVES, S. H.; PINHEIRO, G.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDES, J.; CRUZ, A. P. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5HT<sub>2C</sub> agonists into ventral but not dorsal hippocampus. **Behav. Pharmacol**, v. 15, n. 1, p. 37-43, 2004.

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, p. 571-591, 1989.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4 ed.** (DSMIII) Washington, 1994.

ANDRADE, R. Whole-cell and perforated-patch recording of serotonin responses in the rat hippocampus. **J. Chem. Neuroanat**, n. 5, p. 339-341, 1992.

ANDREWS, N.; HOGG, S.; GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E. 5HT<sub>1A</sub> receptors in the median raphe nucleus and the dorsal hippocampus mediate anxiolytic and anxiogenic effects respectively. **Eur. J. Pharmacol.** v. 264, p. 259-264, 1994.

BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.**, v. 28, n. 3; p. 273-83, 2004.

BARNES, N. M.; CHENG, C. H.; COSTALL, B. G. E.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J. Profiles of interaction of R(+)/S(-)-zacopride and anxiolytic agents in a mouse model. **Eur J Pharmacol**, v. 218, n.1, p. 91-100, 1992.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v.38, p.1083-1152, 1999.

BAXTER, G.; KENNETT, G.; BLANEY, F.; BLACKBURN, T. 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes: a family re-united? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.105, p.105-110, 1995.

BELCHEVA, I; BELCHEVA, S.; PETKOV, V. V.; PETKOV, V. D. Hippocampal asymmetry in the behavioral responses to the 5HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT. **Brain Res**, v. 640, 223-228, 1994.

BERG, K. A.; CLARKE, W. P.; SAILSTAD, C.; SALTZMAN, A.; MAAYANI, S. Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2A and type 2C receptor systems. **Molecular Pharmacology**, v.46, p.477-484, 1994.

BERG, K. A.; MAAYANI, S.; GOLDFARB, J.; SEARMELLINI, C.; LEFF, P.; CLARKE, W. P. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. **Molecular Pharmacology**, v.54, p.94-104, 1998.

BERNIK, A. M., Ansiedade normal e patológica: diferenças entre classes. In: Bernick, M.A. (eds) **Benzodiazepínicos - Quatro décadas de experiência**, Edusp, São Paulo, 1999. p.69-77.

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

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 25, p.205-218, 2001.

BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v. 21, p. 783-789, 1997.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, R. J. Benzodiazepine and serotonergic modulation of antipredator and conspecific defense. **Neurosci Biobehav Rev**, v.22, n.5, p.597-612, 1998a.

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

BONHAUS, D. W.; BACH, C.; DESOUZA, A.; SALAZAR, R. F. H.; MATSOUKA, B. D.; ZUPPAN, P.; CHAN, H. W.; ENGLAN, R. M. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptor gene products: comparison with 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v.115, p.622-628, 1995.

BRADLEY, PB; ENGEL, G; FENIUK, W; FOZARD, JR; HUMPHREY, PP; MIDDLEMISS, DN; MYLECHARANE, EJ; RICHARDSON, BP; SAXENA; PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacology.**, v.25, n.6, p.563-76, 1986.

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

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: A PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.324, p.180-194, 1992.

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

CARVALHO-NETTO, E. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Use of the elevated T-maze for the study of anxiety in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 148, n. 5, p. 119-132, 2004.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 on. **Neurosci. Biobehav. Rev.** (*in press*), 2005.

CHARNEY, D. S.; WOODS, S. W.; GOODMAN, W. K., HENINGER, G. R. Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist mCPP on panic disorder patients and healthy subjects. **Psychopharmacology**, v.92, p.14-21, 1987.

CHOPIN, P.; BRILEY, M. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify serotonergic function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.8, p. 383-388, 1987.

CONNELL, J.; GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; HELLEWELL, J. S. E.; HETEM, L. A.; DEAKIN, J. F. W. 5HT<sub>2</sub> receptors and anxiety. **Behav. Pharmacol.**, v.6, suppl.1, p.35, 1995.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. Anxiolytic effects of 5-HT<sub>3</sub> antagonists in animals. In: WILEY, J. **5-HT<sub>1A</sub> Agonists, 5-HT<sub>3</sub> Antagonists and Bensodiazepines: Their Comparative Behavioural Pharmacology.** (Eds Rodgers, R. J. and Cooper, S. J.). Chichester: [s.n.], 1991. p.133-158.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. Behavioural interactions between 5-hydroxytryptophan, neuroleptic agents and 5-HT receptor antagonists in modifying rodent responding to aversive situations. **Br J Pharmacol**, v.116, n.7, p.2989-2999, 1995.

CRAWLEY, J. N.; GOODWING, F. K. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.13, p.167-170, 1980.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, v.49, p.171-176, 1994.

DJAVADIAN, R. L. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. **Acta Neurobiol Exp.**, v.64, p.189-200, 2004.

DRACTU L. & LADER M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. **J. Bras. Psiq.** v.42, p.19-32, 1993.

DUXON, M. S.; BECKETT, S. R.; BAXTER, G. S., BLACKBURN T. P., FONE, K. C. Intra-amygdala injection of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist BW723C86 produces anxiolysis on the elevated plus maze in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.116, p. 331, 1995.

DUXON, M. S.; FLANIGAN, T. P.; REAVLEY, A. C.; BAXTER, G. S., BLACKBURN, T. P.; FONE, K. C. F. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-<sub>2B</sub> receptor protein in the central nervous system. **Neuroscience**, v.76, p.323-329, 1997.

EBERLE-WANG, K.; LUCKI, I.; CHESSELET, M.-F. A Role for the subthalamic nucleus in 5HT<sub>2C</sub>-induced oral dyskinesia. **Neuroscience**, v.72, p.117-128, 1996.

FACHINI, G; REIS, L. M.; NUNES-DE-SOUZA, R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Microinfusions of 8-OH-DPAT into the ventral hippocampus produce anxiety in the elevated plus-maze in mice. In: INTERNATIONAL BEHAVIORAL NEUROSCIENCE SOCIETY, v. 13, 2004, Key West. **Abstracts of the International Behavioral Neuroscience Society**, 2004, p. 49.

FELDBERG, W.; MYERS, R. D. Effects on temperature of amines injected into cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. **J. Physiol. (Lond)**, v.173, p.226-231, 1964.

FIGUEIREDO, M. S. L. Classificação. In: HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.29-51.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: WILEY, J. **Experimental Approaches to Anxiety and Depression** ( Eds Elliott, J. M.; Heal, D. J. and Marsden, C. A.). Chichester :[s.n.], 1992, p.25-44.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **J. Neurosci.**, v. 16, 4810-4815, 1996.

FILE, S. E.; KENNY, J. P.; CHEETA, S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 66, n. 1, p. 65-72, 2000.

FOGUET, M.; NGUYEN, H.; LÜBBERT, H. Structure of the mouse 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>2</sub> and stomach fundus serotonin receptor genes. **Neuroreport**, v.3, p.345-348, 1992.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, California, USA. 1997.

GADDUM, J. H.; PICARELLI Z. P. Two kinds of tryptamine receptor. **British Journal of Pharmacology**, v.12, p.323-328, 1957.

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

GAO, B.; CUTLER, M. G. Effects of acute and subchronic administration of ritanserin on the social behaviour of mice. **Neuropharmacology**, v.32, n.3, p.265-272, 1993.

GARDNER, C.R. Recent developments in 5HT-related pharmacology of animal models of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.24, p.1479-1485, 1986.

GOLDBERG, H.L.; FINNERTY, R. J. The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. **American Journal of Psychiatric**, v.136, p.1184-1187, 1979.

GONZALEZ, L. E.; ANDREWS N.; FILE, S.E. 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. **Brain Res.**, v.732, p.145-153,1996.

GRAEFF F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G. & BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. (5<sup>o</sup>eds.), Lemos, São Paulo: 1999. p.135-178.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v.163, p.467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.3, p.239-59, 2004.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETO, C.; ZANGROSSI, H. The elevated T maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v.23, n.2, p.237-246, 1998.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 21, n. 6, p. 791-799, 1997.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JR, H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN.; DEN BOER, J. A.; WILLER, P. Eds. **Biological Psychiatry**. John Wiley & Sons Ltd. 2002. p. 1-15.

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

GRIEBEL, G.; MISLIN, R.; PAWLOWSKI, M.; VOGEL, E. m-Clorophenylpiperazine enhances neophobic and anxious behaviour in mice. **Neuroreport**, v. 2, n.10, p.627-629, 1991.

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

GRIEBEL, G. Variability in the effects of 5-HT related compounds in experimental models of anxiety: evidence for multiple mechanisms of 5-HT in anxiety or never ending story? **Pol J Pharmacol**, v. 48, p. 129-136, 1996.

HANDLEY, S. L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v.66, p.103-148, 1995.

HANDLEY, S. L.; McBLANE, J. W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology**, v.112, p.13-20, 1993.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear"-motivated behaviour. **Naunyn-Scmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.327, p.1-5, 1984.

HETEM, L. A. B. Diagnóstico diferencial. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 191-206.

HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacology**, v.92, p. 491-504, 1987.

HORTNAGL, H.; BERGER, M.L., SPERK, G., PIFL, C. Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v.45, p.261-272, 1991.

HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P.R., HUMPHREY, P. P. A. VII International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.46, p.157-203, 1994.

HOYER, D.; MARTIN, G. R. Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. **Behavioral Brain Research**, v.73, p.263-268, 1996.

IVERSEN, S. D. 5-HT and anxiety. **Neuropharmacology**, v. 23, p.1553-1560, 1984.

JOUVET, M. Neurophysiology of the states of sleep. **Physiol Rev.**, v.47, p.117-177, 1967.

KATAOKA, Y.; SHIBATA, K.; MIYAZAKI, A.; INOUE, Y; TOMINAGA, K.; KOIZUMI, S.; UEKI, S.; NIWA, M. Involvement of the dorsal hippocampus in medication of the antianxiety action of tandospirone, a 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonistic anxiolytic. **Neuropharmacology**, v. 30, 475-480; 1991.

KENNETT, G. A.; PITTAWAY, K.; BLACKBURN, T. P. Evidence that 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonists are anxiolytic in the rat Geller-seifter model of anxiety. **Psychopharmacology**, v.114, p.90-96, 1994.

KENNETT, G. A.; BRIGHT, F.; TRAIL, B.; BLACKBURN, T. P.; SANGER, G. J. Effects of SB 204070A and SB 207266A, selective 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists, in three rat models of anxiety. **British Journal of Pharmacology**, v.20, 137p., 1997.

KJELSTRUP, K. G.; TUVNES, F. A.; STEFFENACH, H-A; MURISON, R.; MOSER, E. I.; MOSER M-B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Neurobiology**, v. 99, n.16, p.p. 10825-10830, 2002.

KRETTEK, J.E; PRICE, J.L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat within observations on intra-amygdaloid axonal connections. **J. Comp. Neurol.**, v.178, p. 255-280, 1978.

LADER, M.H. Clinical anxiety and the benzodiazepines. In: PALMER, G. C. **Neuropharmacology of Central Nervous System and Behavioral Disorders**. New York: Academic Press, 1981, p. 225-241.

LeDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J. Neurosci.**, v.8, p. 2517-2529, 1988.

LeDOUX, J. E.; CICCHETTI, P., XAGORARIS, A.; ROMANSKI, L. M. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **J. Neurosci.**, v.10, p.1062-1069, 1990.

LEIBOWITZ, S.F.; SHOR-POSNER, G. Brain serotonin and eating behavior. **Appetite**, 7 (Suppl), p. 1-14, 1986.

LIMA, M. S.; TEIXEIRA, V. A.; VARGAS-DE-ANDRÉA, A. C.; MAGALHÃES, P. V. S. Epidemiologia. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.171-187.

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

LUCKI, I. 5HT<sub>1</sub> receptors and behavior. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.16, p.83-93, 1992.

MARTIN, J. R.; BÖS, M.; JENCK, F.; MOREAU, J.-L.; MUTEL, V.; SLEIGHT, A. J.; WICHMANN, J.; ANDREWS, J. S.; BERENDSEN, H. H. G.; BROEKKAMP, C. L. E.; UIGHT, C. S. F.; KÖHLER, C.; VAN DELFT, A. M. L. 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists: pharmacological characteristics and therapeutic potential. **J Pharmacol Exp Ther**, v.286, p. 913-924, 1998.

McDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog. Brain Res**, v.55, p. 257-332, 1998.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 285-305, 2004.

MENARD J; TREIT D. The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. **Behav Pharmacol.** v.9, n.2, p. 93-101, 1998.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.23, p.591-613, 1999.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MOORE, R.Y.; HALARIS, A.E. Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 164, p.171-184, 1975.

MORA, P. O.; FERREIRA NETO, C.; GRAEFF, F. G. Role 5HT<sub>2A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 58, p.1051-1057, 1997.

MUELLER, E. A.; MURPHY, D. L.; SUNDERLAND, T. Neuroendocrine effects of m-chlorophenylpiperazine, a serotonin agonist, in humans. **J. Clin. Endocrinol Metab**, v.61, p.1179-1184, 1985.

NIC DHONNCHADHA, B. A.; BOURIN, M.; HASCOËT, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT<sub>2</sub> ligands on three mouse models of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.140, 203-214, 2003.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R. V.; GRAEFF, F. G.; PELÁ, I. R. Anxiety-induced antinocioception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam, **Psychopharmacology**, v.150, p.300-301, 2000.

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

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, p. 233-266, 1990.

PAZOS, A.; CORTÉS, R.; PALACIOS, J. M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in rat brain. II: Serotonin-2 receptors. **Brain Research**, v.346, p.231-249, 1985.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.149-167, 1985.

PEREIRA, M. E. C. Conceito de ansiedade. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 3-28.

PEROUTKA, S.J.; SNYDER, S. H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. **Molecular Pharmacology**, v.16, p.687-699, 1979.

PETROVITCH, G.D.; CANTERAS, N.S.; SWASON, L.W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Research Reviews**, v.38, p.247-289, 2001.

PINDER, R.M.; WIERINGA, J.H. Third generation antidepressants. **Med Res Rev.**, v.13, p.259-325, 1993.

PITKÄNEN, A.; AMARAL DG. The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **J Neurosci.**, v.14, n.4, p.2200-24, 1994.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. **Mol Brain Res.**, v.23, p. 163-178, 1994.

PRICE, J.L.; RUSSCHEN, F.T.; AMARAL, D.G. The limbic region. **II: The amygdaloid complex**. New York: Elsevier Science, 1987.

PRZEGALINSK, E.; TATARCZYNSKA, E.; KLODZINSKA, A.; CHOJNACKA-WOJCIK, E. The role of postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the anticonflict effect of ipsapirone. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1109-1115; 1994.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and athological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.52, p.297-303, 1995.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Baz J Med Biol Res**, v. 30, p.289-304, 1997.

ROTH, B. L.; WILLINS, D. L.; KRISTIANSEN, K.; KROEZE, W. K. 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub>-family receptors (5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub>): where structure meets function. **Pharmacology and Therapeutics**, v.79; p.231-257, 1998.

RUTH, R.E.; COLLIER T.J.; ROUTTENBERG, A. Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I Medial and intermediate entorhinal projecting cells. **Journal of comparative Neurology**, v. 209, p. 69-78, 1982.

SAH, P.; FABER, E. S. L.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amigdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev.**, v.83, p.803-854, 2003.

SCHMITT, R.; KAPCZINSKI, F. Transtorno de Ansiedade Generalizada. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 265-283.

SHARMA, A.; PUNHANI, T.; FONE, K. C. F. Distribution of the 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor protein in adult rat brain and spinal cord determined using a receptor-directed antibody: effect of 5,7-dihydroxytryptamine. **Synapse**, v.27, p.45-56, 1997.

SHEARD, M.H. The effect of pCPA on behavior in rats: relation to brain serotonin and 5-HIAA. **Brain Research**, v.15, p. 524-528, 1969.

STEFANSKI, R.; PALEJKO, W.; BIDZINSKI, A.; KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5HT<sub>1A</sub> receptor agonists. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 977-985, 1993.

STEPHENS, D. N.; MELDRUM, B. S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTSNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, v. 90, p.166-169, 1986.

TORK, I. Raphe nuclei and serotonin contain system. In: **The rat nervous system** (Ed. G. Paxinos). Academic Press, San diego, London, 1985. p.43-78.

TURLEJSKI, K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. **Acta Neurobiol Exp. (Wars)**, v.56, p. 619-636, 1996.

VERNEY, C., BAULAC, M., BERGER, B., ALVAREZ, C., VIGNY, A. HELLE, K.B. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. **Neuroscience**, v.14, p.1039-1052, 1985.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v.43, p. 553-561, 1991.

WHITTON, P.; CURZON, G. Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) into the hippocampus. **Psychopharmacology**, v.100, p.138-140, 1990.

WITTER, M.P.; GROENEWEGEN, H.J. Laminar origin and septotemporal distribution of entorhinal and perirhinal projections to the hippocampus in the cat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 224, p. 371-385, 1984.

WRIGHT, D. E.; SERROGY, K. B.; LUNDGREN, K. H.; DAVIS, B. M.; JENNES, L. Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 351, p. 357-373, 1995.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT 1994 acting drugs in the elevated plus-maze. **Braz. J. Med. Biol. Res.**,v.27, p.2453-2456, 1994.

ZANGROSSI, H.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.25, p.637-645, 2001.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.55-74.

ZIFA, E.; FILLION, G. 5-Hydroxytryptamine receptors. **Pharmacol Rev.**, v.44, p.401-458, 1992.

## 9. ANEXOS

**Quadro 1** - Comportamentos registrados em camundongos com infusão intra-HD de mCPP (0; 0,3; 1 e 3 nmoles) e expostos por 5 minutos ao LCE.

### Salina

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	9	60	6	40	116	38,67	64	21,33	120	40,00
2	0	0	22	100	0	0,00	181	60,33	119	39,67
3	6	25	18	75	76	25,33	153	51,00	71	23,67
4	1	5,26	18	94,74	3	1,00	164	54,67	133	44,33
5	3	14,29	18	85,71	10	3,33	102	34,00	188	62,67
6	1	8,33	11	91,67	3	1,00	187	62,33	110	36,67
7	0	0	17	100	0	0,00	122	40,67	178	59,33
8	1	5,56	17	94,44	5	1,67	106	35,33	189	63,00
9	8	34,78	15	65,22	29	9,67	204	68,00	67	22,33
10	5	22,73	17	77,27	33	11,00	126	42,00	141	47,00
11	5	19,23	21	80,77	20	6,67	89	29,67	191	63,67
12	0	0	19	100	0	0,00	181	60,33	119	39,67
13	1	7,69	12	92,31	2	0,67	94	31,33	204	68,00
14	1	5,26	18	94,74	1	0,33	182	60,67	117	39,00
15	3	23,08	10	76,92	6	2,00	97	32,33	197	65,67
<b>MÉDIA</b>	<b>2,93</b>	<b>15,41</b>	<b>15,93</b>	<b>84,59</b>	<b>20,27</b>	<b>6,76</b>	<b>136,80</b>	<b>45,60</b>	<b>142,93</b>	<b>47,64</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>2,99</b>	<b>16,28</b>	<b>4,37</b>	<b>16,28</b>	<b>33,36</b>	<b>11,12</b>	<b>44,31</b>	<b>14,77</b>	<b>45,37</b>	<b>15,12</b>
<b>EPM</b>	<b>0,77</b>	<b>4,20</b>	<b>1,13</b>	<b>4,20</b>	<b>8,61</b>	<b>2,87</b>	<b>11,44</b>	<b>3,81</b>	<b>11,71</b>	<b>3,90</b>

## mCPP 0,3 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	0	0	15	100	0	0,00	116	38,67	184	61,33
2	8	34,78	15	65,22	56	18,67	105	35,00	139	46,33
3	2	10,53	17	89,47	14	4,67	100	33,33	186	62,00
4	2	10,53	17	89,47	11	3,67	98	32,67	191	63,67
5	1	12,5	7	87,5	7	2,33	128	42,67	165	55,00
6	3	13,64	19	86,36	14	4,67	111	37	175	58,33
7	2	9,09	20	90,91	4	1,33	118	39,33	178	59,33
8	0	0	7	100	0	0,00	91	30,33	209	69,67
9	3	15,79	16	84,21	9	3,00	80	26,67	211	70,33
10	0	0	15	100	0	0,00	194	64,67	106	35,33
11	4	28,57	10	71,43	7	2,33	33	11,00	260	86,67
12	1	8,33	11	91,67	1	0,33	140	46,67	159	53,00
13	9	45	11	55	79	26,33	92	30,67	129	43,00
14	2	11,11	16	88,89	5	1,67	159	53,00	136	45,33
15	7	53,85	6	46,15	127	42,33	53	17,67	120	40,00
<b>MÉDIA</b>	<b>2,93</b>	<b>16,91</b>	<b>13,47</b>	<b>83,09</b>	<b>22,27</b>	<b>7,42</b>	<b>107,87</b>	<b>35,96</b>	<b>169,87</b>	<b>56,62</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>2,89</b>	<b>16,36</b>	<b>4,49</b>	<b>16,36</b>	<b>36,65</b>	<b>12,22</b>	<b>39,41</b>	<b>13,14</b>	<b>40,38</b>	<b>13,46</b>
<b>EPM</b>	<b>0,75</b>	<b>4,22</b>	<b>1,16</b>	<b>4,22</b>	<b>9,46</b>	<b>3,15</b>	<b>10,18</b>	<b>3,39</b>	<b>10,43</b>	<b>3,48</b>

## mCPP 1 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	2	22,22	7	77,78	12	4	35	11,67	253	84,33
2	0	0	9	100	0	0	133	44,33	167	55,67
3	1	6,67	14	93,33	3	1,00	164	54,67	133	44,33
4	4	20	16	80	30	10,00	128	42,67	142	47,33
5	2	13,33	13	86,67	20	6,67	61	20,33	219	73,00
6	3	27,27	8	72,73	6	2,00	104	34,67	190	63,33
7	1	5,26	18	94,74	2	0,67	149	49,67	149	49,67
8	14	73,68	5	26,32	155	51,67	25	8,33	120	40,00
9	17	65,38	9	34,62	141	47,00	69	23,00	90	30,00
<b>MÉDIA</b>	<b>4,89</b>	<b>25,98</b>	<b>11,00</b>	<b>74,02</b>	<b>41,00</b>	<b>13,67</b>	<b>96,44</b>	<b>32,15</b>	<b>162,56</b>	<b>54,19</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>6,17</b>	<b>26,26</b>	<b>4,42</b>	<b>26,26</b>	<b>61,51</b>	<b>20,50</b>	<b>50,75</b>	<b>16,92</b>	<b>50,86</b>	<b>16,95</b>
<b>EPM</b>	<b>2,06</b>	<b>8,75</b>	<b>1,47</b>	<b>8,75</b>	<b>20,50</b>	<b>6,83</b>	<b>16,92</b>	<b>5,64</b>	<b>16,95</b>	<b>5,65</b>

## mCPP 3nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	0	0	8	100,00	0	0	123	41	177	59
2	6	27,27	16	72,73	23	7,67	170	56,67	107	35,67
3	0	0	16	100,00	0	0	153	51	147	49
4	0	0	22	100,00	0	0	151	50,33	149	49,67
5	9	45	11	55,00	47	15,67	115	38,33	138	46,00
6	2	14,29	12	85,71	8	2,67	86	28,67	206	68,67
7	0	0	21	100,00	0	0,00	111	37,00	189	63,00
8	0	0	18	100,00	0	0,00	140	46,67	160	53,33
9	1	16,67	5	83,33	4	1,33	55	18,33	241	80,33
10	17	77,27	5	22,73	167	55,67	29	9,67	104	34,67
<b>MÉDIA</b>	<b>3,50</b>	<b>18,05</b>	<b>13,40</b>	<b>81,95</b>	<b>24,90</b>	<b>8,30</b>	<b>113,30</b>	<b>37,77</b>	<b>161,80</b>	<b>53,93</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>5,66</b>	<b>25,74</b>	<b>6,19</b>	<b>25,74</b>	<b>52,18</b>	<b>17,39</b>	<b>45,07</b>	<b>15,02</b>	<b>42,81</b>	<b>14,27</b>
<b>EPM</b>	<b>1,79</b>	<b>8,14</b>	<b>1,96</b>	<b>8,14</b>	<b>16,50</b>	<b>5,50</b>	<b>14,25</b>	<b>4,75</b>	<b>13,54</b>	<b>4,51</b>

**Quadro 2** - Comportamentos registrados em camundongos com infusão intra-HV de mCPP (0; 0,3; 1 e 3 nmoles) e expostos por 5 minutos ao LCE.

### Salina

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	1	6,25	15	93,75	2	0,67	138	46,00	160	53,33
2	0	0	7	100	0	0	254	84,67	46	15,33
3	5	38,46	8	61,54	44	14,67	80	26,67	176	58,67
4	4	14,29	24	85,71	22	7,33	101	33,67	177	59,00
5	6	40	9	60	54	18,00	178	59,33	68	22,67
6	15	50	15	50	84	28,00	101	33,67	115	38,33
7	0	0	14	100	0	0,00	126	42,00	174	58,00
8	4	30,77	9	69,23	8	2,67	33	11,00	259	86,33
9	4	18,18	18	81,82	14	4,67	158	52,67	128	42,67
10	3	16,67	15	83,33	9	3,00	83	27,67	208	69,33
11	6	50	6	50	25	8,33	195	65,00	80	26,67
<b>MÉDIA</b>	<b>4,36</b>	<b>24,06</b>	<b>12,73</b>	<b>75,94</b>	<b>23,82</b>	<b>7,94</b>	<b>131,55</b>	<b>43,85</b>	<b>144,64</b>	<b>48,21</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>4,13</b>	<b>18,74</b>	<b>5,48</b>	<b>18,74</b>	<b>26,69</b>	<b>8,90</b>	<b>62,08</b>	<b>20,69</b>	<b>64,15</b>	<b>21,38</b>
<b>EPM</b>	<b>1,25</b>	<b>5,65</b>	<b>1,65</b>	<b>5,65</b>	<b>8,05</b>	<b>2,68</b>	<b>18,72</b>	<b>6,24</b>	<b>19,34</b>	<b>6,45</b>

### mCPP 0,3 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	2	10,53	17	89,47	15	5	101	33,67	184	61,33
2	2	8,33	22	91,67	7	2,33	125	41,67	168	56,00
3	0	0	8	100	0	0,00	90	30,00	210	70,00
4	14	63,64	8	36,36	173	57,67	54	18,00	73	24,33
5	2	16,67	10	83,33	10	3,33	157	52,33	133	44,33
6	7	41,18	10	58,82	34	11,33	87	29,00	179	59,67
7	17	56,67	13	43,33	150	50,00	64	21,33	86	28,67
8	0	0	11	100	0	0,00	118	39,33	182	60,67
9	7	33,33	14	66,67	62	20,67	146	48,67	92	30,67
10	1	5,88	16	94,12	5	1,67	154	51,33	141	47,00
<b>MÉDIA</b>	<b>5,20</b>	<b>23,62</b>	<b>12,90</b>	<b>76,38</b>	<b>45,60</b>	<b>15,20</b>	<b>109,60</b>	<b>36,53</b>	<b>144,80</b>	<b>48,27</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>6,01</b>	<b>23,52</b>	<b>4,46</b>	<b>23,52</b>	<b>64,15</b>	<b>21,38</b>	<b>36,50</b>	<b>12,17</b>	<b>47,65</b>	<b>15,88</b>
<b>EPM</b>	<b>1,90</b>	<b>7,44</b>	<b>1,41</b>	<b>7,44</b>	<b>20,29</b>	<b>6,76</b>	<b>11,54</b>	<b>3,85</b>	<b>15,07</b>	<b>5,02</b>

## mCPP 1 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	5	41,67	7	58,33	48	16,00	209	69,67	43	14,33
2	9	42,86	12	57,14	47	15,67	154	51,33	99	33
3	2	14,29	12	85,71	5	1,67	79	26,33	216	72
4	5	22,73	17	77,27	22	7,33	151	50,33	127	42,33
5	3	25	9	92	7	2,33	92	30,67	201	67,00
6	7	46,67	8	53,33	24	8,00	122	40,67	154	51,33
7	3	42,86	4	57,14	28	9,33	84	28,00	188	62,67
8	7	41,18	10	58,82	44	14,67	69	23,00	187	62,33
9	1	4,35	22	95,65	8	2,67	144	48,00	148	49,33
10	7	28	18	72	32	10,67	144	48,00	124	41,33
11	3	37,5	5	62,5	16	5,33	30	10,00	254	84,67
12	1	6,67	14	93,33	2	0,67	92	30,67	206	68,67
13	0	0	13	100	0	0,00	185	61,67	115	38,33
<b>MÉDIA</b>	<b>4,08</b>	<b>27,21</b>	<b>11,62</b>	<b>74,09</b>	<b>21,77</b>	<b>7,26</b>	<b>119,62</b>	<b>39,87</b>	<b>158,62</b>	<b>52,87</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>2,81</b>	<b>16,47</b>	<b>5,25</b>	<b>17,32</b>	<b>17,21</b>	<b>5,74</b>	<b>50,55</b>	<b>16,85</b>	<b>57,20</b>	<b>19,07</b>
<b>EPM</b>	<b>0,78</b>	<b>4,57</b>	<b>1,46</b>	<b>4,80</b>	<b>4,77</b>	<b>1,59</b>	<b>14,02</b>	<b>4,67</b>	<b>15,86</b>	<b>5,29</b>

## mCPP 3nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	3	23,08	10	76,92	13	4,33	164	54,67	123	41
2	0	0	13	100	0	0,00	178	59,33	122	40,67
3	4	57,14	3	42,86	11	3,67	13	4,33	276	92,00
4	3	21,43	11	78,57	21	7,00	72	24,00	207	69,00
5	9	37,5	15	62,5	50	16,67	95	31,67	155	51,67
6	1	16,67	5	83,33	11	3,67	46	15,33	243	81,00
7	0	0	5	100	0	0,00	247	82,33	53	17,67
8	6	37,5	10	62,5	25	8,33	42	14,00	233	77,67
<b>MÉDIA</b>	<b>3,25</b>	<b>24,17</b>	<b>9</b>	<b>75,84</b>	<b>16,38</b>	<b>5,46</b>	<b>107,13</b>	<b>35,71</b>	<b>176,50</b>	<b>58,83</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>3,11</b>	<b>19,55</b>	<b>4,24</b>	<b>19,55</b>	<b>16,18</b>	<b>5,39</b>	<b>81,10</b>	<b>27,03</b>	<b>75,59</b>	<b>25,20</b>
<b>EPM</b>	<b>1,04</b>	<b>6,52</b>	<b>1,41</b>	<b>6,52</b>	<b>5,39</b>	<b>1,80</b>	<b>27,03</b>	<b>9,01</b>	<b>25,20</b>	<b>8,40</b>

**Quadro 3** - Comportamentos registrados em camundongos com infusão intra-complexo amigdalóide de mCPP (0; 0,15; 0,5; 1 e 3 nmoles) e expostos por 5 minutos ao LCE.

**Salina**

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	2	50	2	50	10	3,33	56	18,67	234	78,00
2	10	41,67	14	58,33	65	21,67	143	47,67	92	30,67
3	1	6,25	15	93,75	1	0,33	191	63,67	108	36,00
4	3	50	3	50	82	27,33	162	54,00	56	18,67
5	11	50	10	47,62	83	27,67	89	29,67	128	42,67
6	3	42,86	4	57,14	12	4,00	51	17,00	237	79,00
7	2	22,22	7	77,78	6	2,00	246	82,00	48	16,00
8	5	31,25	11	68,75	37	12,33	119	39,67	144	48,00
9	4	25	12	75	22	7,33	185	61,67	93	31
10	0	0	10	100	0	0,00	245	81,67	55	18,33
11	1	12,5	7	87,5	11	3,67	194	64,67	95	31,67
<b>MÉDIA</b>	<b>3,82</b>	<b>30,16</b>	<b>8,64</b>	<b>69,62</b>	<b>29,91</b>	<b>9,97</b>	<b>152,82</b>	<b>50,94</b>	<b>117,27</b>	<b>39,09</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>3,60</b>	<b>18,33</b>	<b>4,39</b>	<b>18,60</b>	<b>32,02</b>	<b>10,67</b>	<b>68,20</b>	<b>22,73</b>	<b>65,60</b>	<b>21,87</b>
<b>EPM</b>	<b>1,09</b>	<b>5,53</b>	<b>1,32</b>	<b>5,61</b>	<b>9,65</b>	<b>3,22</b>	<b>20,56</b>	<b>6,85</b>	<b>19,78</b>	<b>6,59</b>

**mCPP 0,15 nM**

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	1	20	4	80	1	0,33	252	84	47	15,67
2	0	0	6	100	0	0	242	80,67	58	19,33
3	1	14,29	6	85,71	10	3,33	209	69,67	81	27,00
4	2	40	3	60	52	17,33	206	68,67	42	14,00
5	0	0	15	100	0	0	223	74,33	77	25,67
6	0	0	4	100	0	0	162	54,00	138	46,00
7	0	0	6	100	0	0,00	236	78,67	64	21,33
8	6	60	4	40	87	29	104	34,67	109	36,33
9	5	62,5	3	37,5	35	11,67	210	70,00	55	18,33
<b>MÉDIA</b>	<b>1,67</b>	<b>21,87</b>	<b>5,67</b>	<b>78,13</b>	<b>20,56</b>	<b>6,85</b>	<b>204,89</b>	<b>68,30</b>	<b>74,56</b>	<b>24,85</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>2,29</b>	<b>26,00</b>	<b>3,71</b>	<b>26,00</b>	<b>31,22</b>	<b>10,41</b>	<b>46,04</b>	<b>15,35</b>	<b>31,32</b>	<b>10,44</b>
<b>EPM</b>	<b>0,76</b>	<b>8,67</b>	<b>1,24</b>	<b>8,67</b>	<b>10,41</b>	<b>3,47</b>	<b>15,35</b>	<b>5,12</b>	<b>10,44</b>	<b>3,48</b>

## mCPP 0,5 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	6	37,5	10	62,5	52	17,33	184	61,33	64	21,33
2	4	16,67	20	83,33	26	8,67	113	37,67	161	53,67
3	2	25	6	75	7	2,33	239	79,67	54	18,00
4	20	86,96	3	13,04	190	63,33	29	9,67	81	27,00
5	5	35,71	9	64,29	43	14,33	144	48,00	113	37,67
6	1	10	9	90	4	1,33	223	74,33	73	24,33
7	15	55,56	12	44,44	88	29,33	117	39,00	95	31,67
8	3	17,65	14	82,35	48	16,00	109	36,33	143	47,67
9	4	57,14	3	42,86	118	39,33	48	16,00	134	44,67
10	0	0	3	100	0	0	253	84,33	47	15,67
11	0	0	4	100	0	0,00	266	88,67	34	11,33
12	4	22,22	14	77,78	24	8,00	146	48,67	130	43,33
13	2	40	3	60	19	6,33	45	15,00	236	78,67
<b>MÉDIA</b>	<b>5,08</b>	<b>31,11</b>	<b>8,46</b>	<b>68,89</b>	<b>47,62</b>	<b>15,87</b>	<b>147,38</b>	<b>49,13</b>	<b>105,00</b>	<b>35,00</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>5,89</b>	<b>24,87</b>	<b>5,44</b>	<b>24,87</b>	<b>55,40</b>	<b>18,47</b>	<b>80,95</b>	<b>26,98</b>	<b>56,02</b>	<b>18,67</b>
<b>EPM</b>	<b>1,63</b>	<b>6,90</b>	<b>1,51</b>	<b>6,90</b>	<b>15,37</b>	<b>5,12</b>	<b>22,45</b>	<b>7,48</b>	<b>15,54</b>	<b>5,18</b>

## mCPP 1 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	0	0	2	100	0	0,00	268	89,33	32	10,67
2	1	16,67	5	83,33	2	0,67	260	86,67	38	12,67
3	0	0	5	100	0	0,00	255	85,00	45	15,00
4	0	0	3	100	0	0,00	269	89,67	31	10,33
5	0	0	2	100	0	0,00	174	58,00	126	42,00
6	2	22,22	7	77,78	24	8,00	175	58,33	101	33,67
7	0	0	7	100	0	0,00	209	69,67	91	30,33
8	0	0	6	100	0	0,00	273	91,00	27	9,00
<b>MÉDIA</b>	<b>0,38</b>	<b>4,86</b>	<b>4,63</b>	<b>95,14</b>	<b>3,25</b>	<b>1,08</b>	<b>235,38</b>	<b>78,46</b>	<b>61,38</b>	<b>20,46</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>0,74</b>	<b>9,12</b>	<b>2,07</b>	<b>9,12</b>	<b>8,41</b>	<b>2,80</b>	<b>42,61</b>	<b>14,20</b>	<b>38,56</b>	<b>12,85</b>
<b>EPM</b>	<b>0,26</b>	<b>3,23</b>	<b>0,73</b>	<b>3,23</b>	<b>2,97</b>	<b>0,99</b>	<b>15,07</b>	<b>5,02</b>	<b>13,63</b>	<b>4,54</b>

## mCPP 3 nM

Sujeitos	EA		EF		TA		TF		TC	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
1	0	0	4	100	0	0	208	69,33	92	30,67
2	0	0	11	100	0	0,00	234	78,00	66	22,00
3	1	16,67	5	83,33	15	5,00	49	16,33	236	78,67
4	1	20	4	80	24	8,00	214	71,33	62	20,67
5	5	35,71	9	64,29	67	22,33	151	50,33	82	27,33
6	5	41,67	7	58,33	181	60,33	83	27,67	36	12,00
7	1	6,25	15	93,75	1	0,33	159	53,00	140	46,67
8	0	0	4	100	0	0,00	250	83,33	50	16,67
9	0	0	7	100	0	0,00	208	69,33	92	30,67
10	0	0	7	100	0	0,00	162	54,00	138	46,00
<b>MÉDIA</b>	<b>1,30</b>	<b>12,03</b>	<b>7,30</b>	<b>87,97</b>	<b>28,80</b>	<b>9,60</b>	<b>171,80</b>	<b>57,27</b>	<b>99,40</b>	<b>33,13</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>2,00</b>	<b>15,92</b>	<b>3,56</b>	<b>15,92</b>	<b>57,50</b>	<b>19,17</b>	<b>65,02</b>	<b>21,67</b>	<b>58,86</b>	<b>19,62</b>
<b>EPM</b>	<b>0,63</b>	<b>5,03</b>	<b>1,13</b>	<b>5,03</b>	<b>18,18</b>	<b>6,06</b>	<b>20,56</b>	<b>6,85</b>	<b>18,61</b>	<b>6,20</b>

**Quadro 4** - Teste de homogeneidade de Levene sobre os parâmetros registrados no LCE em camundongos que receberam microinjeção de mCPP intra-HD.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>		
	<b>Effect</b>	<b>Effect</b>	<b>Effect</b>	<b>Error</b>	<b>Error</b>	<b>Error</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>EA</b>	56,29935	3	18,76645	287,5247	45	6,389438	2,937105	0,043318
<b>LOG10</b>	0,150997	3	0,050332	1,865083	45	0,041446	1,214397	0,315415
<b>%_EA</b>	553,9261	3	184,642	7167,23	45	159,2718	1,159289	0,335761
<b>EF</b>	20,21263	3	6,737544	253,3641	45	5,630314	1,196655	0,321836
<b>%_EF</b>	553,9261	3	184,642	7167,23	45	159,2718	1,159289	0,335761
<b>TA</b>	3803,676	3	1267,892	39890,61	45	886,4579	1,43029	0,246409
<b>%_TA</b>	422,6307	3	140,8769	4432,289	45	98,49532	1,43029	0,246409
<b>TF</b>	1614,385	3	538,1283	24239,11	45	538,6468	0,999037	0,402024
<b>%_TF</b>	179,3761	3	59,79204	2693,234	45	59,84965	0,999037	0,402024
<b>TC</b>	617,8487	3	205,9496	26558,54	45	590,1897	0,348955	0,790064
<b>%_TC</b>	68,64985	3	22,88328	2950,949	45	65,57664	0,348955	0,790064

**Quadro 5** - Análise de variância (ANOVA) de um fator sobre os parâmetros registrados no LCE em camundongos que receberam microinjeção de mCPP intra-HD.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>		
	<b>Effect</b>	<b>Effect</b>	<b>Effect</b>	<b>Error</b>	<b>Error</b>	<b>Error</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>EA</b>	26,58118	3	8,860393	835,2556	45	18,56123	0,47736	0,699628
<b>LOG10</b>	0,190722	3	0,063574	6,635858	45	0,147464	0,431118	0,731718
<b>%_EA</b>	684,9035	3	228,3012	18936,61	45	420,8136	0,542523	0,655682
<b>EF</b>	141,9946	3	47,33152	1049,067	45	23,31259	2,030298	0,123102
<b>%_EF</b>	684,9035	3	228,3012	18936,61	45	420,8136	0,542523	0,655682
<b>TA</b>	2732,621	3	910,8737	89164,77	45	1981,439	0,459703	0,711801
<b>%_TA</b>	303,6246	3	101,2082	9907,196	45	220,1599	0,459703	0,711801
<b>TF</b>	10993,1	3	3664,365	88112,46	45	1958,055	1,871432	0,147993
<b>%_TF</b>	1221,455	3	407,1517	9790,273	45	217,5616	1,871432	0,147993
<b>TC</b>	5828,899	3	1942,966	88828,49	45	1973,966	0,984296	0,40868
<b>%_TC</b>	647,6554	3	215,8851	9869,832	45	219,3296	0,984296	0,40868

**Quadro 6** - Teste de homogeneidade de Levene sobre os parâmetros registrados no LCE em camundongos que receberam microinjeção de mCPP intra-HV.

	SS	df	MS	SS	df	MS		
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error	F	p
<b>EA</b>	43,82814	3	14,60938	230,3062	38	6,060691	2,410514	0,081926
<b>%_EA</b>	232,3791	3	77,45969	3236,239	38	85,16419	0,909534	0,44549
<b>EF</b>	7,044229	3	2,348076	275,7251	38	7,255924	0,323608	0,808249
<b>%_EF</b>	167,1694	3	55,72315	3044,145	38	80,10908	0,695591	0,560495
<b>TA</b>	9164,365	3	3054,788	16623,76	38	437,4673	6,982895	0,000743
<b>LOG10</b>	0,255089	3	0,08503	5,021654	38	0,132149	0,643438	0,59187
<b>%_TA</b>	1018,263	3	339,4209	1847,084	38	48,60748	6,982895	0,000743
<b>LOG10</b>	0,245774	3	0,081925	2,663406	38	0,07009	1,168858	0,334311
<b>TF</b>	6205,957	3	2068,652	33882,12	38	891,6348	2,320067	0,090722
<b>%_TF</b>	689,5508	3	229,8503	3764,68	38	99,07053	2,320067	0,090722
<b>TC</b>	2665,351	3	888,4505	35465,35	38	933,2987	0,951947	0,425275
<b>%_TC</b>	296,1502	3	98,71672	3940,595	38	103,6999	0,951947	0,425275

**Quadro 7** - Análise de variância (ANOVA) de um fator sobre os parâmetros registrados no LCE em camundongos que receberam microinjeção de mCPP intra-HV.

	SS	df	MS	SS	df	MS		
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error	F	p
<b>EA</b>	17,55052	3	5,850172	658,5685	38	17,33075	0,33756	0,798251
<b>%_EA</b>	97,94847	3	32,64949	14424,08	38	379,5812	0,086015	0,967275
<b>EF</b>	84,41269	3	28,13756	936,1587	38	24,63576	1,142143	0,344449
<b>%_EF</b>	36,36799	3	12,12266	14766,12	38	388,5822	0,031197	0,992467
<b>TA</b>	4829,686	3	1609,895	49542,22	38	1303,743	1,234826	0,310471
<b>LOG10</b>	0,244473	3	0,081491	16,0848	38	0,423284	0,19252	0,900843
<b>%_TA</b>	536,6317	3	178,8772	5504,691	38	144,8603	1,234826	0,310471
<b>LOG10</b>	0,160569	3	0,053523	9,456601	38	0,248858	0,215074	0,885333
<b>TF</b>	3703,897	3	1234,632	127237,1	38	3348,344	0,368729	0,775976
<b>%_TF</b>	411,5441	3	137,1814	14137,45	38	372,0382	0,368729	0,775976
<b>TC</b>	6089,563	3	2029,854	140841,2	38	3706,348	0,54767	0,652755
<b>%_TC</b>	676,6181	3	225,5394	15649,02	38	411,8164	0,54767	0,652755

**Quadro 8** - Teste de homogeneidade de Levene sobre os parâmetros registrados no LCE em camundongos que receberam microinjeção de mCPP no complexo amigdalóide.

	SS	df	MS	SS	df	MS		
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error	F	p
<b>EA</b>	70,89608	4	17,72402	292,4606	46	6,35784	2,787742	0,037263
<b>LOG10</b>	0,108884	4	0,027221	1,753566	46	0,038121	0,714071	0,586594
<b>%_EA</b>	1115,117	4	278,7791	5197,124	46	112,981	2,467488	0,05791
<b>EF</b>	49,80229	4	12,45057	259,2392	46	5,635634	2,209259	0,082685
<b>%_EF</b>	1113,793	4	278,4484	5229,552	46	113,6859	2,449278	0,059382
<b>TA</b>	7034,897	4	1758,724	36441,06	46	792,1969	2,22006	0,081462
<b>%_TA</b>	781,6553	4	195,4138	4049,006	46	88,02187	2,22006	0,081462
<b>TF</b>	7905,332	4	1976,333	56236,73	46	1222,538	1,616582	0,186168
<b>%_TF</b>	878,3702	4	219,5925	6248,526	46	135,8375	1,616582	0,186168
<b>TC</b>	4104,558	4	1026,14	44841,68	46	974,819	1,052646	0,390679
<b>%_TC</b>	456,062	4	114,0155	4982,408	46	108,3132	1,052646	0,390679

**Quadro 9** - Análise de variância (ANOVA) de um fator sobre os parâmetros registrados no LCE em camundongos que receberam microinjeção de mCPP complexo amigdalóide.

	SS	df	MS	SS	df	MS		
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error	F	p
<b>EA<sup>*</sup></b>	159,6224	4	39,90561	628,5344	46	13,66379	2,920537	0,031056
<b>LOG10</b>	2,05723	4	0,514307	4,907614	46	0,106687	4,820702	0,002482
<b>%_EA<sup>#</sup></b>	5137,394	4	1284,349	19053,08	46	414,1974	3,100813	0,024271
<b>EF</b>	117,6605	4	29,41514	801,7512	46	17,42937	1,687676	0,169064
<b>%_EF<sup>#</sup></b>	5179,422	4	1294,856	19152,67	46	416,3624	3,109924	0,023971
<b>TA</b>	10440,61	4	2610,153	85131,31	46	1850,681	1,410375	0,245519
<b>%_TA</b>	1160,068	4	290,017	9459,034	46	205,6312	1,410375	0,245519
<b>TF<sup>#</sup></b>	52361,51	4	13090,38	192859,1	46	4192,589	3,122266	0,023571
<b>%_TF<sup>#</sup></b>	5817,946	4	1454,486	21428,79	46	465,8432	3,122266	0,023571
<b>TC</b>	19734,65	4	4933,664	130124,7	46	2828,797	1,744085	0,156575
<b>%_TC</b>	2192,739	4	548,1848	14458,3	46	314,3108	1,744085	0,156575

\* Teste de Dunnett:  
controle vs 0,15 nM, controle vs 0,5 nM, controle vs 1 nM e controle vs 3nM,  $p < 0,05$ .

# Teste de Dunnett:  
controle vs 1nM,  $p < 0,05$ .