

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

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES 5-HT₂ DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL SUPRIME O EFEITO ANSIOLÍTICO RESULTANTE
DO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} DO NÚCLEO
MEDIANO DA RAPE EM CAMUNDONGOS.**

Vanessa Nunes de Souza

São Carlos – SP
2011

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

**BLOQUEIO DOS RECEPTORES 5-HT₂ DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL SUPRIME O EFEITO ANSIOLÍTICO RESULTANTE
DO ANTAGONISMO DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} DO NÚCLEO
MEDIANO DA RAPE EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora : Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

São Carlos – SP
2011

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

S729br

Souza, Vanessa Nunes de.

O bloqueio dos receptores 5-HT2 da substância cinzenta periaquedutal suprime o efeito ansiolítico resultante do antagonismo dos receptores 5-HT1A do núcleo mediano da rafe em camundongos / Vanessa Nunes de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

71 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Ansiedade. 2. Labirinto em cruz elevado. 3. 5-HT2. 4. Substância cinzenta periaquedutal. 5. Camundongo. I. Título.

CDD: 615.78 (20^a)

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Vanessa Nunes de Souza

Dia 15/12/2011

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

Profª. Drª. Cláudia Maria Padovan..... *Cláudia Maria Padovan*

Profª. Drª. Christie Ramos Andrade Leite Panissi..... *Christie Ramos Andrade Leite Panissi*

Profª. Drª. Cleopatra da Silva Planeta..... *Cleopatra da Silva Planeta*

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase..... *Luiz Fernando Takase*

*DEDICO este trabalho aos meus pais
Aparecido e Marilena pelo apoio e
incentivo em todos os momentos da
minha vida, alegres ou difíceis. A
vocês, minha gratidão por tudo que
fizeram e fazem por mim.*

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À professora Azair, pela orientação, pelo acolhimento, confiança, incentivo e valiosa contribuição à minha formação científica.

Ao professor Ricardo, pela colaboração neste trabalho, sempre presente e com valiosas sugestões.

Ao professor Robert John Rodgers, que também colaborou para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À banca examinadora, pela atenção prestada na leitura deste trabalho.

À técnica do laboratório de Psicologia da Aprendizagem da UFSCar, Lara Silveira, pelo auxílio no dia-a-dia e pela grande amizade.

Aos Técnicos do laboratório de Farmacologia da FCF/UNESP, pela colaboração sempre que necessário.

Aos amigos do laboratório Gabriel, Cilene, Daniela, Bárbara, Kelly, Carol, Lucas sempre presentes nos momentos bons ou difíceis;

Aos meus pais, pelo apoio *incondicional* em todas as escolhas da minha vida;

Ao Alexandre pela competência profissional na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas;

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
Medo e Ansiedade	9
Reações de Defesa	10
Substrato Neural	12
Núcleo Mediano da Rafe	14
Substância Cinzenta Periaquedutal	17
Modelo Animal de Ansiedade: Labirinto em Cruz Elevado	19
Serotonina e Ansiedade	20
OBJETIVO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
Sujeitos	28
Drogas	28
Cirurgia e Injeção de drogas	28
Equipamentos e Procedimentos	29
Análise Comportamental	30
Histologia	31
Análise Estatística	32
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICE	63

NUNES-DE-SOUZA,V. **Bloqueio dos receptores 5-HT₂ da substância cinzenta periaquedutal suprime o efeito ansiolítico resultante do antagonismo dos receptores 5-HT_{1A} do núcleo mediano da rafe em camundongos.** 2011. 77f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, São Carlos.

RESUMO

Várias evidências apontam o envolvimento de neurônios serotoninérgicos do núcleo mediano da rafe (NMnR) na ansiedade. Sabe-se que o bloqueio dos autorreceptores somatodendríticos dos núcleos da rafe aumenta a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos, promovendo a liberação de serotonina em sítios pós-sinápticos como amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (SCP). Contudo, enquanto a ativação de receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT₂ da amígdala ou hipocampo resulta em aumento da ansiedade em camundongos, a estimulação de ambos os receptores na substância cinzenta periaquedutal resulta em efeitos antiaversivos. Nessa perspectiva, o presente estudo investigou se o efeito ansiolítico induzido pela desinibição farmacológica dos neurônios serotoninérgicos do NMnR é suprimido pelo bloqueio dos receptores 5-HT₂ da SCP. Para isso, camundongos receberam injeções combinadas de cetanserina na SCP (10 nmol/0,1µl), antagonista dos receptores 5-HT_{2B/2C}, seguidas por injeções intra-NMnR de WAY100635 (5,6 nmol/0,1µl), antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}. Os animais foram, então, individualmente expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) durante cinco minutos. Os testes foram gravados para posterior análise dos índices convencionais e etológicos de ansiedade. Os resultados confirmaram que infusões intra-NMnR de WAY100635 (5,6 nmol/0,1µl) reduzem os parâmetros comportamentais de ansiedade sem alterar índices de atividade locomotora, e que este efeito é completamente bloqueado pelo pré-tratamento com uma dose intrinsecamente inativa de cetanserina (10 nmol/0,1µl) na SCP. Dessa forma, estes resultados sugerem que os receptores 5-HT₂ da SCP desempenham um papel significativo na redução da ansiedade observada após a desinibição dos neurônios serotoninérgicos do NMnR.

NUNES-DE-SOUZA,V. **Blockade of 5-HT₂ receptors in the periaqueductal grey matter (PAG) abolishes the anxiolytic-like effect of 5-HT_{1A} receptor antagonism in the median raphé nucleus in mice.** 2011. 77f. Thesis (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, São Carlos.

ABSTRACT

Several lines of evidence support the involvement of serotonergic (5-HT) neurons of the median raphe nucleus (MRN) in anxiety-like behaviour. In this context, it is known that blockade of 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptors in the midbrain raphe nuclei increases the firing rate of these neurons, disinhibiting 5-HT release in postsynaptic target areas such as amygdala, hippocampus and periaqueductal grey matter (PAG). However, while activation of 5-HT_{1A} or 5-HT₂ receptors in forebrain targets such as the amygdala or hippocampus enhances anxiety-like behaviours in rodents, stimulation of both receptor subtypes in the midbrain PAG markedly reduces anxiety-like behaviour. In view of these findings, the present study investigated whether the anti-anxiety effects induced by pharmacological disinhibition of 5-HT neurons in the MRN are attenuated by the blockade of 5-HT₂ receptors within the PAG. Mice received combined intra-PAG injection with ketanserin (10 nmol/0.1 µl), a 5-HT₂ receptor antagonist, followed by intra-MRN injection of WAY-100635 (5.6 nmol/0.1 µl), a highly selective 5-HT_{1A} receptor antagonist. They were then individually exposed to the elevated plus-maze (EPM), with the videotaped behavioural sessions subsequently scored for both conventional and ethological measures. The results confirmed that intra-MRN infusion of WAY100635 (5.6 nmol/0.1 µl) reduces behavioural indices of anxiety without significantly altering general activity measures, and further showed that this effect was completely blocked by intra-PAG pretreatment with an intrinsically-inactive dose of ketanserin (10 nmol/0.1 µl). Together, these results suggest that 5HT₂ receptor populations located within the midbrain PAG play a significant role in the reduction of anxiety observed following disinhibition of 5-HT neurons in the MRN.

INTRODUÇÃO

1. Medo e Ansiedade

O medo e a ansiedade são estados emocionais correlatos, qualificados como subjetivamente desagradáveis, que são acompanhados por sentimentos de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais (NUTT, 1990). Lader (1981) atribui como causa principal da ansiedade a antecipação de um perigo, porém com ausência de reconhecimento de uma ameaça real ou, quando existente, a resposta à ameaça torna-se desproporcional à intensidade da emoção.

Graeff (1990) cita como uma das raízes principais da ansiedade o sentimento de medo, por ser encontrado em praticamente todas as espécies e que tem como função sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. A diferença entre os dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (BLANCHARD et al, 1990).

Historicamente, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade teve início nos relatos de Darwin (reimpressão em 2000), em sua obra, “A expressão das emoções no homem e nos animais”, a qual afirma que o homem, tendo os animais como seus ancestrais, compartilha com estes suas emoções básicas. De acordo com essa perspectiva, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que se originam nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência (DEAKIN e GRAEFF, 1991).

Dessa forma, quando nos referimos à ansiedade e ao medo, podemos considerá-los como estados emocionais essenciais dentro do repertório afetivo humano, uma vez que até determinado grau, estas emoções podem favorecer o desempenho em tarefas de natureza motora e cognitiva. Contudo, quando estas emoções superam níveis considerados de

normalidade, interferindo no cotidiano do indivíduo, estas passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano, caracterizando Transtornos de Ansiedade. Assim, a investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (como os roedores) é de crucial importância para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos estados de medo e ansiedade (GRAY e McNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al, 2001; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002).

2. Reações de Defesa

Dentre as várias fontes de perigo com as quais os animais podem se defrontar encontram-se os confrontos com o predador ou com animais da mesma espécie, estímulos ambientais tais como altura, iluminação, estímulos dolorosos e ambientes ou objetos desconhecidos. Diante desses estímulos os animais geralmente utilizam uma de quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão. A escolha de uma estratégia particular leva em consideração vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou o ambiente (ADAMS, 1979; MARKS, 1987; BLANCHARD e BLANCHARD, 1988).

As estratégias comportamentais exibidas por roedores (ratos e camundongos) em situações de ameaça foram classificadas de acordo com o nível de ameaça: potencial ou real; se real, distal ou proximal. No nível de ameaça potencial, as estratégias observadas incluem comportamentos de avaliação de risco, caracterizados por movimentos exploratórios cautelosos e hesitantes, com posturas e movimentos do corpo que possibilitem a aproximação e a investigação da possível ameaça. Quando a ameaça é real, são observados comportamentos de fuga ou imobilidade no caso de um estímulo distal e no caso de um

estímulo proximal (predador muito próximo ou em contato direto com o animal), comportamentos de fuga ou luta defensiva (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al, 1997).

Alguns autores sugerem que a distinção entre medo e ansiedade reside exatamente nestas estratégias comportamentais citadas acima. Assim, quando o estímulo é potencialmente ameaçador, são desencadeados comportamentos de avaliação de risco, caracterizando um estado de ansiedade. Quando o estímulo ou situação ameaçadora é real, os comportamentos apresentados (luta ou fuga) caracterizariam medo. Dessa forma, modelos animais de medo e ansiedade favorecem a expressão de comportamentos defensivos frente a situações artificiais ou naturais de perigo, permitindo a compreensão de suas bases neurobiológicas subjacentes (BLANCHARD et al, 1993).

A essa análise etoexperimental, Gray e McNaughton (2000) adicionaram componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade. Esses autores também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e ansiedade. Assim, quando a situação permite aproximação em direção ao estímulo aversivo, os comportamentos observados de avaliação de risco e inibição comportamental estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente estratégias de defesa do tipo esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados ao medo. Esses autores ainda ressaltam a importância dos efeitos de determinados fármacos na diferenciação do medo e da ansiedade: comportamentos relacionados ao medo, tais como fuga e luta são insensíveis a compostos ansiolíticos clinicamente testados, como por exemplo, os benzodiazepínicos, enquanto aqueles relacionados à ansiedade (avaliação de risco) são sensíveis a essas drogas.

3. Substrato Neural

Grande parte do conhecimento atual das estruturas encefálicas relacionadas ao medo e ansiedade provém de estudos clássicos da neurofisiologia que utilizaram métodos como a ablação, estimulação elétrica e estimulação química de estruturas encefálicas. Hess e Brügger (1943) demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial em gatos eliciava respostas defensivas de luta e fuga, acompanhadas de alterações neurovegetativas, que se assemelhavam às respostas eliciadas por um confronto com um predador. Os seguidores de Hess confirmaram os achados descritos em 1943, observando que a estimulação elétrica de estruturas como a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal também eliciava respostas defensivas. Dessa forma, o hipotálamo medial, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal foram agrupados hierarquicamente compondo o *Sistema Cerebral Aversivo* (SCA) (para uma revisão, ver DEAKIN e GRAEFF, 1991; BRANDÃO et al, 2003; HETEM e GRAEFF, 2003).

A ativação desse sistema está associada à emissão de respostas incondicionadas caracterizadas por intensa atividade motora (acompanhada de saltos) e alterações autonômicas como elevação da pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (BRANDÃO et al, 1994). Posteriormente, foram propostas as participações do colículo inferior e de camadas profundas do colículo superior nesse sistema. Postula-se que o colículo inferior seja uma plataforma importante de vias auditivas, de modo que parece atuar no processamento de informações acústicas de natureza aversiva (BRANDÃO et al, 1999). Já o colículo superior processa informações visuais e parece atuar no controle de movimentos orientados dos olhos e cabeça, bem como na mediação de comportamentos defensivos e mudanças cardiovasculares que seriam apropriadas em uma emergência, como a presença de um predador ou um objeto em curso de colisão (DEAN et al, 1989).

A organização de respostas condicionadas, por sua vez, é efetuada pelo *Sistema de Inibição Comportamental* (SIC), proposto inicialmente pelo psicólogo britânico Jeffrey Gray. A ativação desse sistema, representado pelo septo e hipocampo, por determinadas classes de estímulos ambientais (sinais de frustração ou punição, estímulos ameaçadores inatos e novidade) resultava em inibição comportamental e aumento da vigilância em animais de laboratório. Estudos posteriores demonstraram que as alterações comportamentais produzidas por lesão do sistema septo-hipocampal eram as que mais se assemelhavam às produzidas pela ação de substâncias ansiolíticas. Dessa forma, foi proposto que o sistema composto pelo septo e pelo hipocampo seria o principal substrato neural do SIC e que drogas ansiolíticas aliviarão a ansiedade porque prejudicariam o seu funcionamento (GRAY, 1982).

Posteriormente, Gray e McNaughton (2000) propuseram a integração entre o constructo do SIC e o do SCA, na qual a principal função do sistema septo-hipocampal seria a de detectar conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo. Nessa perspectiva, dois sistemas seriam ativados, o “sistema cerebral de aproximação” (representado principalmente pelo núcleo acumbente) incentivando a busca de satisfação das necessidades biológicas como alimento e sexo, e o sistema cerebral aversivo (SCA), gerando tendências de esquiva ou fuga das fontes de perigo inatas ou aprendidas. Nesse caso, o sistema septo-hipocampal detectaria ambas as tendências (aproximação e evitação), inibindo o comportamento e aumentando os níveis de atenção, eliciando assim, comportamentos como a avaliação de risco que caracterizam um estado de ansiedade. É importante ressaltar que quando a fonte de ameaça não induz tendência de aproximação, mas somente esquiva ou fuga, não há ansiedade e sim medo.

No intuito de revisar e expandir os conceitos da teoria de Gray e McNaughton (2000), McNaughton e Corr (2004) postularam que as estruturas que comandam as reações de defesa implicadas na ansiedade e no medo estão igualmente organizadas em uma hierarquia

funcional (do córtex ao tronco encefálico), atuando de acordo com a distância (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al, 1993) em que se encontra da fonte de perigo. Dessa forma, comportamentos relacionados à ansiedade (ex: avaliação risco) seriam organizados e expressados principalmente por estruturas prosencefálicas como o córtex, sistema septo-hipocampal e amígdala, embora estruturas anatomicamente mais caudais como a substância cinzenta periaquedutal e o hipotálamo também participem de maneira sutil no controle de tais comportamentos.

De fato, estudos mostram que além de controlar fundamentalmente comportamentos relacionados ao medo, tais como fuga e luta (MISSLIN, 2003), a substância cinzenta periaquedutal participa da elaboração e expressão de comportamentos relacionados à ansiedade, tais como esquiva e avaliação de risco (CAROBREZ et al, 2001; BERTOGLIO et al, 2005).

4. Núcleo Mediano da Rafe

Os núcleos da rafe (do francês *raphé*, costura, sutura) são formados por um conjunto de neurônios que se localizam na linha média do tronco encefálico e constituem a principal fonte de serotonina (5-HT) do sistema nervoso central (WIRTSHAFTER, 2001; ADELL et al, 2002; HORNUNG, 2003; WALTHER e BADER, 2003; TAKASE E NOGUEIRA, 2008; MOKLER et al, 2009). Dahlström e Fuxe (1964) demonstraram através da técnica de histofluorescência, a existência de nove grupos de células serotoninérgicas (tabela 1) que foram identificadas como B₁ a B₉ que se projetam para porções superiores do encéfalo e para o tronco e medula espinhal (BURT, 1993; HOFFMAN e LEFKOWITS, 1996; CARLSON, 2002).

Ao longo do bulbo, localizam-se os núcleos da rafe caudais, denominados pálido (B₁), obscuro (B₂ e B₄) e magno (B₃), os quais se projetam para o tronco encefálico inferior (KANDEL et al, 2003; VERTES e LINLEY, 2007) e, por meio de três projeções paralelas, para as colunas dorsal, intermédia e ventral da medula espinhal (HORNUNG, 2003). O núcleo magno envia projeções para o corno dorsal da medula e está reconhecidamente envolvido no controle da dor (KINGSLEY, 2000).

Tabela 1: descrição anatômica dos grupos de células serotoninérgicas da rafe e da formação reticular, e a classificação correspondente apresentada por Dahlström e Fuxe (1964). Adaptada de Törk e Hornung, 1990.

Estrutura contendo neurônios serotoninérgicos	Grupos
Núcleo pálido	B ₁
Núcleo obscuro	B ₂
Núcleo obscuro, parte dorsolateral	B ₄
Núcleo magno	B ₃
Medula oblonga ventrolateral rostral	B ₃
Núcleo reticular paragigantocelular lateral	B ₃
Medula oblonga ventrolateral caudal	B ₁
Núcleo mediano, parte caudal	B ₅
Núcleo mediano, parte rostral	B ₈
Núcleo dorsal, parte caudal	B ₆
Núcleo principal dorsal, parte rostral	B ₇
Núcleo linear caudal	B ₈
Núcleo pontino	B ₈ / B ₉
Região supralemniscal	B ₉

Na ponte e no mesencéfalo estão os núcleos da rafe rostrais, denominados pontino (B₅), dorsal (B₆ e B₇), mediano (B₅ e B₈), linear caudal (B₈) e supralemniscal (B₉), os quais, na

maioria, possuem fibras que ascendem para partes superiores do tronco encefálico e prosencéfalo basal, desempenhando papéis importantes na regulação do ciclo sono-vigília e na modulação de comportamentos motivacionais e emocionais. (STAMP e SEMBA, 1995; KANDEL et al, 2003; VERTES E LINLEY, 2007).

Dentre os núcleos da rafe, o núcleo dorsal (NDR) e mediano (NMnR) são os que apresentam maior número de neurônios serotoninérgicos, representando, portanto, a maior fonte de serotonina oriunda de vias ascendentes (BOBILLIER et al, 1975; AZMITIA e SEGAL, 1978; MOLLIVER, 1987). As fibras que partem do NDR são finas e difusas, com varicosidades pequenas ou granulares (fibras D). Por outro lado, as fibras que partem do NMnR são grossas e apresentam grandes botões arredondados ou ovais (fibras M), cujos terminais estabelecem sinapses assimétricas bem definidas com a célula alvo. Estes dois sistemas provavelmente coexistem em todas as áreas do cérebro, mas sua distribuição pode variar consideravelmente: o córtex é a região que recebe mais intensamente os dois tipos de fibras; o estriado, hipocampo ventral, amígdala, e núcleo acumbente recebem inervação principalmente do sistema de fibras varicosas finas (a partir do NDR), enquanto o hipocampo dorsal, hipotálamo e septo recebem fibras oriundas principalmente do NMnR (KOSOFKY e MOLLIVER, 1987; MAMOUNAS e MOLLIVER, 1988; TÖRK, 1990; HENSLER, 2006; MOKLER et al, 2009). É importante ressaltar que axônios do NMnR se distribuem densamente no NDR, o qual envia recíprocas projeções ao NMnR, sugerindo uma possível coordenação de ambos os núcleos na liberação da serotonina (VERTES et al, 1999).

Entre esses núcleos, o NMnR foi menos estudado em relação ao NDR em virtude de seu tamanho reduzido e de sua profunda localização no tronco encefálico (ADELL e ARTIGAS, 1999; HOPWOOD E STAMFORD, 2001; ADELL et al, 2002; JUDGE e GARTSIDE, 2006). O NMnR se estende a partir do limite caudal da decussação do pedúnculo cerebelar

superior até o nível do núcleo motor do trigêmeo (HENSLER, 2006). É dividido em uma região mediana (o NMnR propriamente dito), região paramediana na sua metade caudal e duas extensões laterais na formação reticular. Os neurônios serotoninérgicos se concentram na região mediana, diminuindo a sua quantidade nas divisões laterais do núcleo (BACKER et al, 1991).

5. Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura que circunda o aqueduto cerebral. É subdividida anatômica e funcionalmente em quatro colunas longitudinais ao longo de seu eixo rostro-caudal, denominadas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral devido às suas posições em relação ao aqueduto (BEITZ, 1985; CARRIVE, 1993; BANDLER e SHIPLEY, 1994). Os primeiros estudos direcionados a essa estrutura datam da década de 1930, e concentraram-se em determinar a participação da SCP no processamento da informação nociceptiva (MAGOUN et al, 1937).

Além da modulação e do processamento da dor, a SCP está envolvida ainda com a regulação autonômica, comportamento sexual, comportamento maternal, vocalização e comportamento predatório, além do medo e ansiedade (BEHBEHANI, 1995). De fato, a localização neuroanatômica e abundantes conexões aferentes e eferentes com áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (MANTHY, 1982; BEITZ, 1990; BANDLER et al, 1991; CANTERAS e SWANSON, 1992; CANTERAS, 2002; SEWARDS e SEWARDS, 2002) confere à SCP um papel importante na modulação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo.

Dependendo da qualidade do estímulo, ocorre ativação de colunas específicas da SCP (CANTERAS e GOTO, 1999; COMOLI et al, 2003). A coluna dorsolateral está particularmente envolvida na integração de uma resposta comportamental ativa, caracterizada por comportamentos de luta ou fuga desencadeada por estresse de origem psicológico, como a exposição ao predador, na ausência de contato físico (KEAY e BANDLER, 2001), enquanto a coluna ventrolateral integra uma resposta comportamental passiva, caracterizada por imobilidade e hiporeatividade a estímulos externos, desencadeada por estresse inevitável de origem física, como dor muscular ou visceral (VIANNA et al, 2001). A resposta comportamental ativa pode desencadear através de ativação secundária da SCP ventrolateral, um período de resposta passiva no intuito de restabelecer o organismo (KEAY e BANDLER, 2001).

Evidências importantes referentes ao envolvimento da SCP com o medo e ansiedade foram obtidas por Nashold e colaboradores (1969). Estes autores relataram que a estimulação elétrica da SCP de pacientes neurocirúrgicos produziu sentimentos de medo intenso, pânico, desconforto, bem como manifestações de morte iminente associados a alterações autonômicas como aumento da frequência cardíaca e respiratória, sudorese e piloereção semelhantes aos ataques de pânico observados na clínica. Diante dessas evidências a SCP tem sido sugerida como uma estrutura chave na modulação e expressão de comportamentos defensivos do tipo luta ou fuga relacionados aos ataques de pânico em humanos (GRAEFF, 1990; JENCK et al, 1995).

No entanto, Mcnaughton e Corr (2004) argumentaram que estruturas anatomicamente mais caudais como a SCP e o hipotálamo, além de coordenarem e expressarem comportamentos intempestivos do tipo luta ou fuga relacionados ao estado de medo, também participam, juntamente com estruturas prosencefálicas (córtex pré-frontal, sistema septo-hipocampal e amígdala) do controle de comportamentos defensivos mais elaborados e

orientados como a esquiwa e a avaliação de risco, os quais têm sido relacionados à ansiedade.

6. Modelo Animal de Ansiedade: Labirinto em Cruz Elevado

Dentre os principais testes de ansiedade em animais, o labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido o mais amplamente utilizado. O teste, inicialmente proposto por Montgomery (1955), foi modificado e validado para ratos (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELOW et al, 1985) e camundongos (STEPHENS et al, 1986; LISTER, 1987) e é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos. O aparato é composto de dois braços fechados (com paredes) unidos ortogonalmente a dois braços abertos por uma plataforma central. Os índices principais de ansiedade compreendem medidas espaço-temporais de esquiwa dos braços abertos, enquanto a atividade locomotora é avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (LISTER, 1987; FILE, 1992). O aumento da atividade nos braços abertos (medido pelas porcentagens de entradas e tempo gasto nestes locais) indica redução da ansiedade, enquanto mudanças no número de entradas nos braços fechados indicam efeitos não específicos na atividade locomotora (LISTER, 1987; FILE, 1992; CRUZ et al, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995).

A principal vantagem de modelos como o LCE, os quais não envolvem aprendizagem, em relação aos modelos condicionados que empregam punição, é a não utilização de estímulos nocivos como choque elétrico ou privação de água ou comida. Tais estímulos poderiam interferir no comportamento do animal, e assim dificultar as análises de ansiedade (PELOW et al, 1985; LISTER, 1990).

Vários trabalhos têm demonstrado uma sensibilidade aumentada em certos procedimentos e posturas relacionadas ao padrão defensivo de avaliação de risco em roedores (RODGERS et al, 1992; ADAMEC et al, 1993; CRUZ et al, 1994; SHEPHERD et al, 1994; GRIEBEL et al, 1996, 1997). Estas medidas etológicas compreendem comportamentos em que o animal

explora vigorosa e extensivamente o ambiente no intuito de coletar informações sobre a possível ameaça. Tais comportamentos têm sido relacionados a estados ansiosos, sendo mais frequentemente executados por camundongos quando comparados a ratos (GRAY e McNAUGTON, 2000; BLANCHARD et al, 2001).

As esticadas e mergulhos compreendem comportamentos de orientação e aproximação da ameaça. Os levantamentos caracterizam comportamentos de exploração vertical. Tais ações têm como função informar as estratégias comportamentais utilizadas frente a situações de perigo potencial, sendo frequentemente mais sensíveis às ações de drogas como agonistas parciais de receptores 5-HT_{1A}, que falham em alterar a esquiva dos braços abertos ou o fazem em doses que afetam a atividade locomotora (RODGERS et al, 1997; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

7. Serotonina e Ansiedade

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma molécula sinalizadora que desempenha grande número de funções em muitas espécies e em vários tecidos (TURLEJSKI, 1996). No sistema nervoso central, este neurotransmissor desempenha papel regulador de muitas funções cerebrais como termorregulação, sono, agressão e ingestão de alimentos (FELDBERG e MYERS, 1994; JOUVET, 1967; SHEARD, 1969; LUCKI, 1992). Uma disfunção na sinalização serotoninérgica é um dado importante presente em estados psicopatológicos como depressão, distúrbios alimentares e ansiedade (PINDER e WIERINGA, 1993; LEIBOWITZ e SHOR-POSNER, 1986; CHOPIN e BRILEY, 1987).

Os receptores de serotonina são divididos em 7 famílias (5-HT₁ a 5-HT₇), sendo ainda subdivididos em 14 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ e 5-HT₇) (BARNES e SHARP, 1999). Muitos

estudos têm focado o envolvimento dos receptores do subtipo 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₄ nos mecanismos da ansiedade (GOLDBERG e FINNERTY, 1979; COSTALL e NAYLOR, 1991; KENNETT et al, 1994; FILE et al, 1996; KENNETT 1997; MENARD e TREIT, 1998; NUNES-DE-SOUZA et al, 2000; CANTO-DE-SOUZA et al, 2002; FACHINI E CANTO-DE-SOUZA, 2006; MARUCCI e CANTO-DE-SOUZA, 2006; MARUCCI et al, 2006; CORNÉLIO E NUNES-DE-SOUZA, 2007; NUNES-DE-SOUZA et al, 2008; GOMES e NUNES DE SOUZA, 2009). Especial interesse tem sido dedicado aos receptores do subtipo 5-HT₂ centrais, dado o fato deste receptor constituir um dos possíveis alvos de drogas utilizadas no tratamento de distúrbios como enxaqueca, esquizofrenia, depressão e ansiedade (BAXTER et al, 1995).

A família dos receptores 5-HT₂ é composta por 3 subtipos de receptores pós-sinápticos acoplados à proteína G, conhecidos como 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} (BARNES e SHARP, 1999). Embora existam diferenças regionais na distribuição dos receptores 5-HT₂, todos estão presentes no sistema nervoso central (NIC DHONNCHADHA et al, 2003). Foram identificadas elevadas quantidades de receptores 5-HT_{2A} no córtex frontal, núcleos da base e menores níveis em algumas estruturas do sistema límbico como hipocampo, septo e amígdala (ZIFA e FILLION, 1992; HOYER et al, 1994; POMPEIANO et al, 1994). Os receptores 5-HT_{2B} estão concentrados no hipocampo, córtex, mesencéfalo e hipotálamo (BONHAUS et al, 1995), embora proteínas receptoras deste subtipo de receptor também tenham sido encontradas na amígdala lateral e septo lateral de ratos (DUXON et al, 1995, 1997). A maior expressão de receptores 5-HT_{2C} está presente no plexo coróide, núcleo septal lateral, núcleo subtalâmico, amígdala, hipocampo, substância negra, cerebelo e substância cinzenta periaquedutal (PAZOS et al, 1985; ZIFA e FILLION, 1992; HOYER et al, 1994; ABRAMOWSKI et al, 1995; WRIGHT et al, 1995; SHARMA et al, 1997, CLEMETT et al, 2000).

O papel da serotonina na modulação dos estados de ansiedade pode estar relacionado ao tipo de estímulo aversivo (condicionado ou incondicionado), além do sítio de ação no sistema nervoso central (DEAKIN e GRAEFF, 1991; HANDLEY, 1995; GRAEFF et al, 1997). Em 1991, Deakin e Graeff propuseram a teoria do papel dual da serotonina na ansiedade. Segundo estes autores, a serotonina pode atuar facilitando o comportamento defensivo, ou inibindo-o, dependendo dos sítios e dos subtipos de receptores serotoninérgicos que atuam no sistema nervoso central.

No sistema nervoso central, os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos são encontrados principalmente nos núcleos dorsal (NDR) e mediano (NMnR) da rafe (BOBILIER et al, 1975; AZMITIA e SEGAL, 1978; VERTES et al, 1999). Sabe-se que o NMnR possui alta densidade de receptores 5-HT_{1A}, que atuam como autorreceptores somatodendríticos que regulam a síntese e liberação de serotonina nas suas áreas de projeção (AGHAJANIAN, 1972; ADELL et al, 1993; KIA et al, 1996; HALL et al, 1997; KALSNER, 2000; WALTHER e BADER, 2003; TAKASE e NOGUEIRA, 2008; MOKLER et al, 2009). Dessa forma, a ativação desses receptores por agonistas como o 8-OH-DPAT inibe o disparo dos neurônios serotoninérgicos e diminui a liberação de serotonina em sítios pós-sinápticos, enquanto o bloqueio desses mesmos receptores por antagonistas seletivos como o WAY100635, leva a um aumento na taxa de disparo desses neurônios como resultado do bloqueio da inibição tônica exercida pela serotonina endógena (ADELL et al, 1993; FORMAL et al, 1996; MUNDEY et al, 1996; McQUADE e SHARP, 1997; DUDLEY et al, 1999; HADDJERI et al, 2004).

Vários estudos tentam esclarecer a relação entre serotonina e ansiedade, contudo, a maioria dos resultados aponta inconsistências que devem ser consideradas. Assim, algumas evidências indicam que a ansiedade está ligada a um aumento na ativação da via que liga o NMnR ao hipocampo. Por exemplo, lesões eletrolíticas e químicas do NMnR resultaram em

diminuição dos índices de ansiedade no LCE e teste claro escuro quando os animais foram submetidos a um estímulo estressor 24 horas antes dos testes (ANDRADE e GRAEFF, 2001). Similarmente, microinjeções de agonistas 5-HT_{1A} (como o 8-OH-DPAT) no NMnR diminuíram os índices da ansiedade em testes como o LCE, labirinto em T elevado (LTE), interação social, claro-escuro e condicionamento contextual (CARLI e SAMANIN, 1988; ANDREWS et al, 1994; DE ALMEIDA et al, 1998; AVANZI e BRANDÃO, 2001; AVANZI et al, 2003; SILVA et al, 2004; DOS SANTOS et al, 2005; BORELLI et al, 2005; DOS SANTOS et al, 2008). Em todos esses casos, a redução da ansiedade foi decorrente da supressão da via serotoninérgica que liga o NMnR ao hipocampo. Em contrapartida, Canto-de-Souza et al, (2002), reportaram que injeções intra-NMnR de WAY100635, diminuíram os parâmetros de ansiedade em camundongos avaliados no LCE. Como a ativação de receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT₂ do hipocampo e da amígdala tanto de ratos (ALVES et al, 2004; CRUZ et al, 2005), como de camundongos (NUNES-DE-SOUZA et al, 2000; NUNES-DE-SOUZA et al, 2002; CORNÉLIO e NUNES-DE-SOUZA, 2007) resulta em efeitos ansiogênicos, estes autores propuseram que os dados obtidos em 2002 poderiam estar relacionados à ação da serotonina em outros sítios pós-sinápticos que também recebem inervação do NMnR.

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma complexa estrutura mesencefálica que recebe inervação do NMnR (VERTES et al, 1999) e cujo papel na regulação de respostas defensivas é bem conhecido (BANDLER et al, 1985; CARRIVE, 1993; GRAEFF, 1994; LOVICK, 1994; DE OCA et al, 1998). Numerosos estudos demonstraram que a estimulação elétrica ou química da porção dorsal da SCP induz a emissão de respostas vigorosas de defesa, como fuga e saltos que se alternam com posturas de congelamento em ratos e camundongos (DI SCALA, et al, 1984; BANDLER et al, 1985; AGUIAR et al, 2006; CARVALHO-NETO et al, 2006; MIGUEL e NUNES-DE-SOUZA, 2006). Estas respostas

defensivas que são muito similares às eliciadas pela exposição a predadores naturais (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988), são atenuadas pela ativação de receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT₂ da SCP (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF et al, 1996; GRAEFF et al, 1997; CASTILHO et al, 2002; GRAEFF, 2004; OLIVEIRA et al, 2007).

Alguns trabalhos já demonstraram a existência de expressão significativa da proteína do receptor 5-HT_{2C} nas regiões dorsal, lateral e ventral da SCP (PAZOS et al, 1985; ABRAMOWSKI et al, 1995; CLEMETT et al, 2000). Nós recentemente demonstramos que infusões intra-SCP de mCPP, um agonista 5-HT_{2B/2C}, reduziu os índices de ansiedade em camundongos avaliados no LCE, efeito que foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento, na mesma estrutura, com cetanserina, um antagonista 5-HT₂ (NUNES-DE-SOUZA et al, 2008). A hipótese de que a serotonina exerce efeito ansiolítico agindo sobre os receptores 5-HT_{2C} na SCP é fortalecida com os resultados obtidos por Gomes e Nunes-de-Souza (2009), que observaram que injeções intra-SCP de DOI (agonista preferencial 5-HT_{2A}) não alteraram os parâmetros de ansiedade, enquanto microinjeções intra-SCP de MK-212 (agonista 5-HT_{2C}) resultaram em efeito ansiolítico em camundongos já na primeira exposição ao LCE. Na realidade, estes autores constataram que as microinjeções intra SCP de DOI atenuam a ansiedade de camundongos somente em uma segunda exposição ao LCE.

Como o NMnR também envia projeções para a SCP (VERTES et al, 1999), onde a serotonina exerce quase que invariavelmente efeitos antiaversivos atuando principalmente sobre os receptores 5-HT_{2C}, o presente estudo teve por objetivo avaliar se o efeito ansiolítico produzido pelo bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} do NMnR é suprimido pelo pré-tratamento com cetanserina, um antagonista 5-HT_{2A/2C}, microinjetado na SCP de camundongos submetidos ao LCE.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a participação da via que liga o NMnR à SCP na modulação da ansiedade em camundongos avaliados no LCE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar o efeito ansiolítico obtido a partir de injeções de WAY100635 no NMnR de camundongos avaliados no LCE.

- Investigar se o efeito ansiolítico resultante do bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} do NMnR é suprimido pelo pré-tratamento intra- SCP com cetanserina, um antagonista 5-HT_{2A/2C}, em camundongos avaliados no LCE.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa *Suíço-albino*, machos pesando entre 25-30g provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os animais foram agrupados em grupos de 10 em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm), mantidos em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$), luz (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas as 7:00 horas) e livre acesso a alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

Os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) para o trabalho com animais de laboratório e aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos (043/2008).

2. Drogas

WAY100635 (N - {2 - [4 -(2- metoxifenil)-1- piperazina] etil } - N - (2-piridinil) ciclohexacarboxiamida triidrocloreto) e cetanserina (3-[2-[4-(4-fluorobenzoil)-1-piperidinil] etil]-2,4 [1H,3H]- quinazolinediona tartarato) (Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA) foram dissolvidas em veículo (solução salina 0,9% e 10% de Tween 80).

As doses de WAY100635 (5,6 nmol/0,1 μ l) e cetanserina (10nmol/0,1 μ l) foram baseadas em estudos prévios (CANTO-DE-SOUZA et al, 2002; SOARES e ZANGROSSI, 2004; NUNES-DE-SOUZA et al, 2008).

3. Cirurgia e injeção de drogas

Os animais receberam implantação craniana de cânulas-guia (25gauge) de 7 mm de comprimento na SCP e de 12 mm de comprimento no NMnR, ambas sob ângulo de 26° em

relação ao eixo vertical, após anestesia com solução de cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg) i.p. (MESSIER et al, 1999). As cânulas foram fixadas com cimento acrílico com base nas coordenadas estereotáxicas definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (1997): **SCP:** 4,1 mm posterior ao bregma , +1,3 mm lateral à linha média e -1,2 mm ventral à superfície craniana. **NMnR:** 3,7 mm posterior ao bregma , +2,2 mm lateral à linha média e -3,4 mm ventral à superfície craniana.

As pontas das cânulas-guia foram posicionadas $\pm 2,0$ mm dorsal às estruturas alvo. Um mandril, o qual foi removido durante o procedimento de injeção, foi inserido no interior das cânulas-guia para evitar problemas de obstrução e para reduzir contaminação. A analgesia pós-operatória foi realizada durante 3 dias adicionando paracetamol (200mg/ml) à água dos animais em uma razão de 0,2 ml de paracetamol para 250ml de água (concentração final: 0,16mg/ml).

As soluções foram injetadas na SCP e no NMnR através de agulhas de injeção cujo comprimento ultrapassava 2,0 mm as pontas das cânulas-guia. Cada agulha de injeção foi conectada por meio de um tubo de polietileno (PE-10) a uma microsseringa Hamilton de 10 μ l. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 – Equipamentos científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1 μ l de solução na SCP e no NMnR durante 60 segundos. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução.

4. Equipamentos e procedimentos

O labirinto em cruz elevado (LCE) (Fig.2) consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos por uma plataforma central (5 x 5 cm) a dois braços fechados constituídos de vidro transparente (30 x 5 x 15 cm). O aparato fica elevado do solo a 38,5 cm (modificado de LISTER, 1987).

Após um período de recuperação de 5 dias após a cirurgia, os animais receberam injeções das soluções de cetanserina (0 ou 10 nmol/0,1 μ l) na SCP e depois de um período de 10 minutos, de WAY100635 (0 ou 5,6 nmol/0,1 μ l) no NMnR. Cinco minutos após a última injeção, os animais foram colocados individualmente sobre a plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços abertos. Os grupos formados foram: veículo+veículo (V+V), veículo + WAY100635 (V+WAY), cetanserina + veículo (CET+V) e cetanserina + WAY100635 (CET+WAY). Foi permitido aos animais explorar o aparato durante 5 minutos. Após este período, o labirinto era limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% (v/v) e seco com papel toalha. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera (Panasonic-X12) posicionada em um ângulo de aproximadamente 45°, para posterior análise dos resultados.



Figura 1: Labirinto em Cruz Elevado (Modificado de Lister, 1987)

5. Análise comportamental

Os comportamentos foram avaliados através da análise das fitas gravadas, por um observador treinado, utilizando o programa de análise etológica X-Plo-Rat, (BECERRA-GARCIA et al, 2005). Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (LISTER, 1987), quanto os etológicos (RODGERS et al, 1997).

Medidas Convencionais: Frequência de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço definida pelo cruzamento das quatro patas no interior do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Estes dados foram usados para o cálculo das porcentagens de entrada e tempo de permanência dos animais nos braços abertos: $[(\text{Frequência entradas}/\text{total}) \times 100]$ e $[(\text{Tempo no compartimento}/300) \times 100]$.

Medidas Etológicas: Frequência de levantamentos (*Rearing*- elevação do corpo sobre as patas traseiras), mergulhos (*head-dipping*- movimentos exploratórios da cabeça/ombros em direção ao solo), posturas de esticar o corpo (*stretched attend postures (SAP)*- movimentos que consistem em esticar o corpo e retrai-lo à posição original, sem ocorrência de locomoção) e duração de imobilidade. Como os sinais de tigmotaxia são importantes para a exploração no LCE (TREIT et al, 1993), os comportamentos de mergulhar e esticar o corpo foram diferenciados quanto ao local de sua ocorrência no labirinto. Os braços fechados e a plataforma central foram designados áreas “protegidas” do labirinto, enquanto os braços abertos foram designados como áreas “desprotegidas” (RODGERS e JOHNSON, 1995). Os dados coletados nestes compartimentos são mostrados na forma de total e porcentagem $[(\text{frequência protegido}/\text{total}) \times 100]$ de cada comportamento.

6. Histologia

Após o término dos experimentos os animais receberam injeção de 0,1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno na SCP e no NMnR de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Os animais receberam uma dose de anestésico 3 vezes maior que a usualmente utilizada para a anestesia [solução de cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg) i.p.], foram decapitados, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina a 10% para, posteriormente, sofrerem secções coronais de 80 micrômetros (µm) ao longo do trajeto das cânulas. As secções foram inspecionadas através de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou os locais das injeções. Os animais cujas injeções não atingiram a SCP e o NMnR foram excluídos da análise estatística em função da variedade de estruturas atingidas, o que impossibilitou a formação de um grupo para análise.

7. Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Quando necessário, os dados foram transformados em log₁₀, raiz quadrada ou raiz cúbica antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores (fator 1: pré-tratamento – cetanserina) e (fator 2: tratamento – WAY100635). Quando apropriado, os resultados foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A análise histológica confirmou canulação positiva na SCP e no NMnR em um total de 31 animais. Canulações negativas foram identificadas em 49% dos animais. Cabe salientar que uma das principais dificuldades metodológicas do presente estudo foi a canulação no NMnR, uma estrutura de tamanho reduzido localizada em uma região de difícil acesso no tronco encefálico.

Apenas os sujeitos cujos sítios de injeção estavam localizados na SCP e no NMnR foram incluídos na análise estatística. Os seguintes grupos foram formados: Veículo+Veículo (V+V) (n=7); Veículo+WAY100635 (V+WAY) (n=8); Cetanserina+Veículo (CET+V) (n=8) e Cetanserina+WAY100635 (CET+WAY) (n=8).

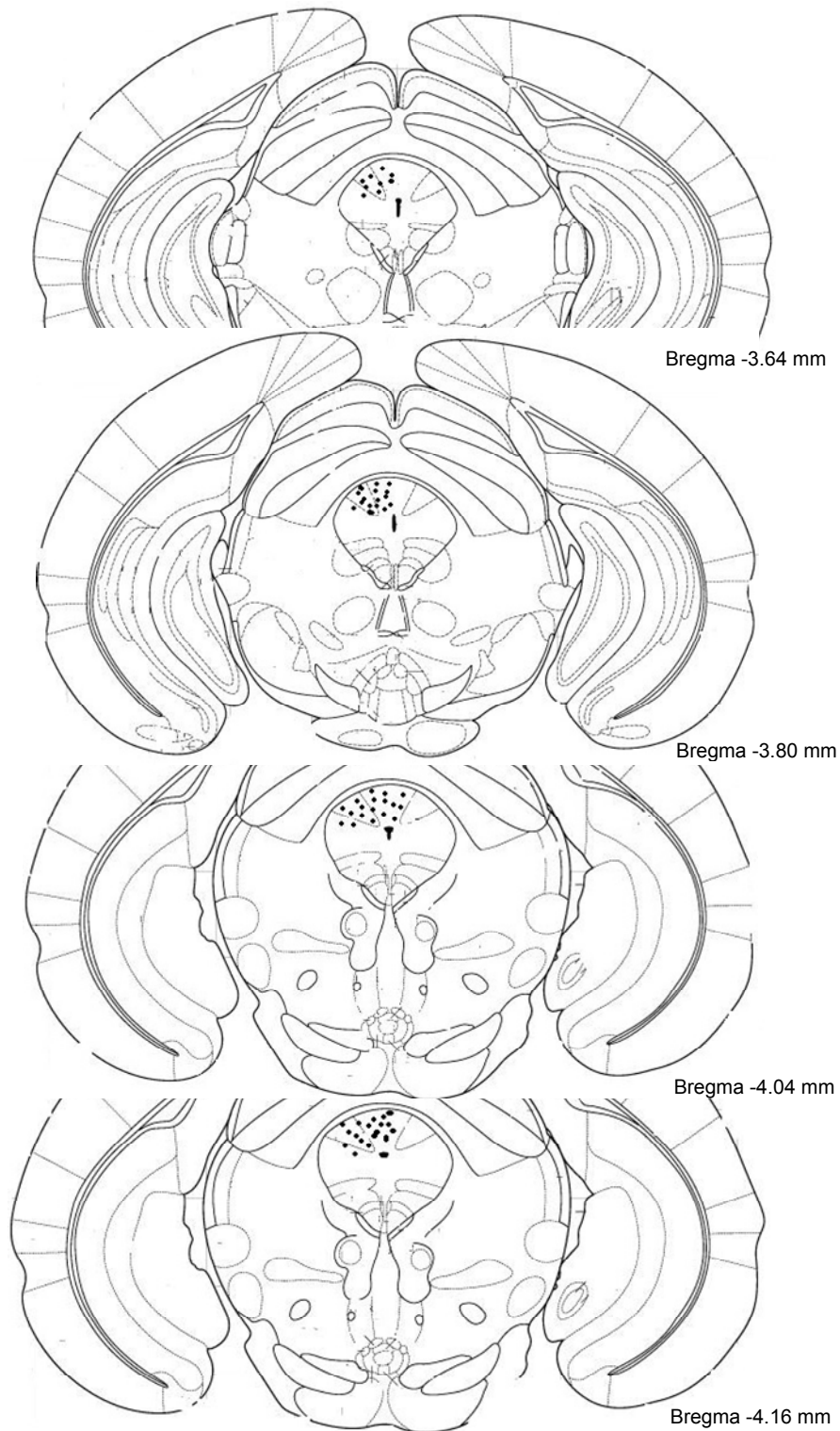


Figura 2: Representação esquemática dos sítios de injeção na coluna dorsal da SCP de camundongos (Franklin e Paxinos, 1997). O número de pontos é menor que o número total de animais devido à sobreposição.

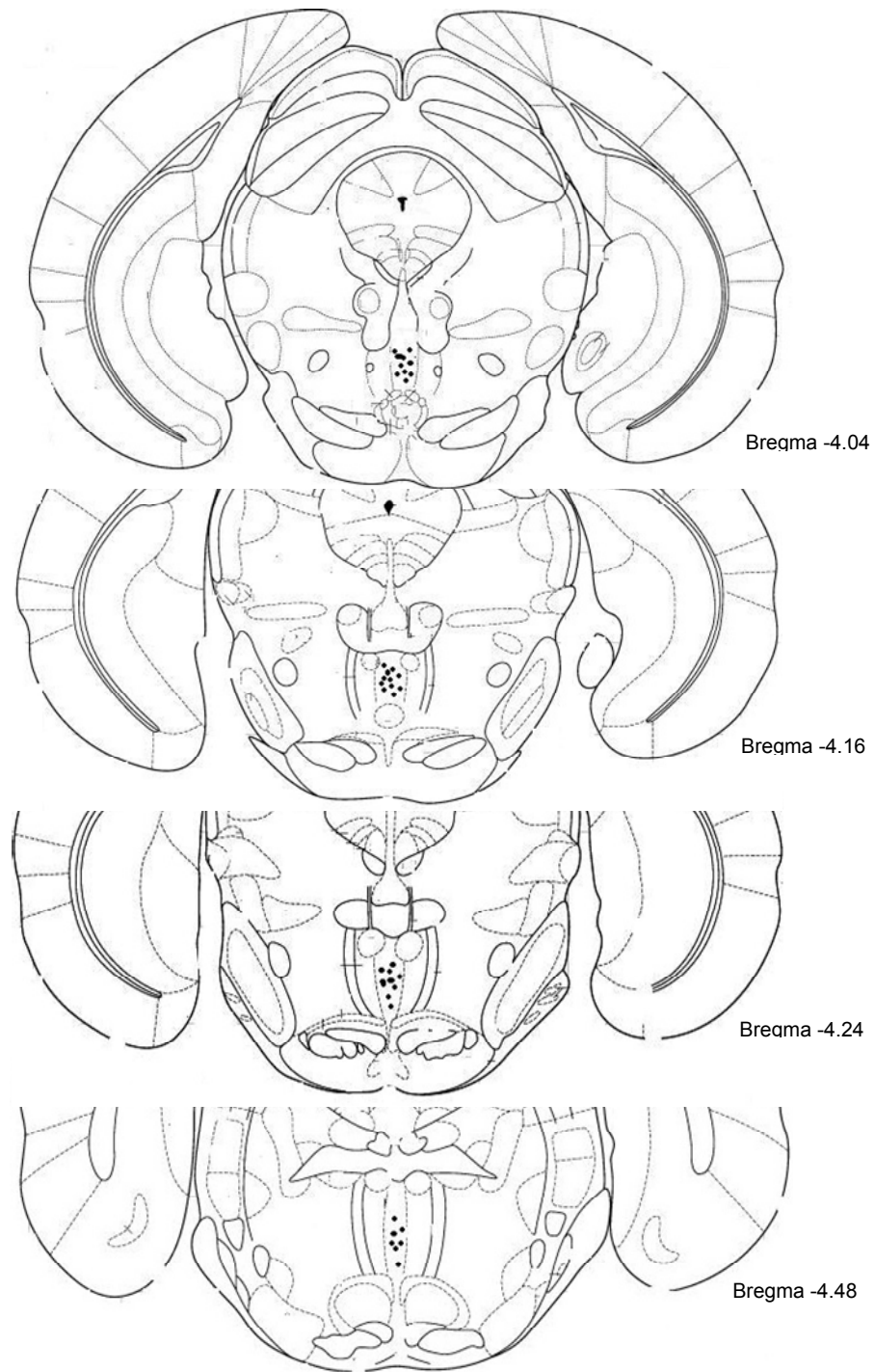


Figura 3: Representação esquemática dos sítios de injeção no NMNR de camundongos (Franklin e Paxinos, 1997). O número de pontos é menor que o número total de animais devido à sobreposição.

A Figura 4 mostra os efeitos da injeção combinada de cetanserina na SCP (0 e 10 nmol/0,1µl) e WAY100635 (0 e 5,6 nmol/0,1µl) no NMnR de camundongos avaliados no LCE. A ANOVA de dois fatores (fator 1: pré-tratamento – SCP) (fator 2: tratamento – NMnR) não apontou diferença significativa nas entradas nos braços fechados para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 0,04, P > 0,05$), tratamento ($F_{(1,27)} = 2,04, P > 0,05$) e interação pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0,22, P > 0,05$) ($P > 0,05$).

A análise estatística indicou diferença significativa para o tratamento na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(1,27)} = 6,43, P < 0,05$) e ausência de efeitos para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 2,64, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 2,03, P < 0,05$). O teste de Duncan revelou aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos para o grupo (V+WAY) em relação ao grupo (V+V) ($P < 0,05$) e diminuição significativa para os grupos (CET+V) e (CET+WAY) em relação ao grupo (V+WAY) ($P < 0,05$). Com relação à porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, a ANOVA de dois fatores apontou diferença significativa para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 4,43, P < 0,05$), tratamento ($F_{(1,27)} = 4,83, P < 0,05$) e interação pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 5,72, P < 0,05$). A análise *pos-hoc* indicou aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos para o grupo (V+WAY) em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) e diminuição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos para os grupos (CET+V) e (CET+WAY) quando comparados ao grupo (V+WAY) ($P < 0,05$).

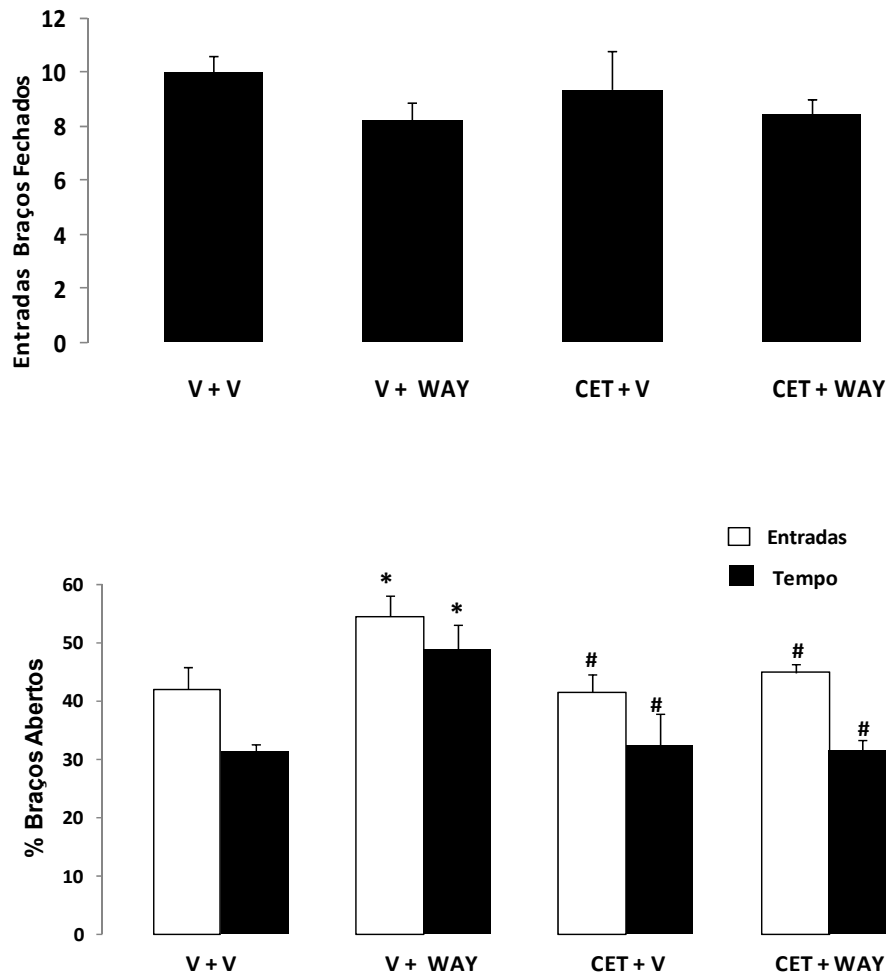


Figura 4: Efeito da injeção combinada de cetanserina na SCP (0 e 10 nmol/0,1µl) e WAY100635 no NMNR (0 e 5,6 nmol/0,1µl) de camundongos sobre a frequência de entradas nos braços fechados e porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. Os dados representam a média + EPM (n = 7-8).

* $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (V+V) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan).

$P < 0,05$, comparado ao grupo (V+WAY) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan).

A Tabela 2 mostra os efeitos da injeção combinada de cetanserina na SCP (0 e 10 nmol/0,1µl) e WAY100635 (0 e 5,6 nmol/0,1µl) no NMnR nos demais comportamentos avaliados no LCE.

A análise estatística não revelou diferença significativa para o total de entradas com relação ao pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 2,29, P > 0,05$), tratamento ($F_{(1,27)} = 0,01, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0,30, P > 0,05$). No que diz respeito às entradas nos braços abertos a ANOVA de duas vias indicou diferença significativa para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 5,00, P < 0,05$), mostrando ausência de significância para o tratamento ($F_{(1,27)} = 3,72, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 1,37, P > 0,05$). O teste de Duncan revelou aumento significativo para as entradas nos braços abertos para o grupo (V+WAY) em relação ao grupo (V+V) e diminuição neste mesmo parâmetro para o grupo (CET+WAY) em relação ao grupo (V+WAY) ($P < 0,05$). A respeito dos dados referentes à porcentagem de tempo gasto nos braços fechados, a análise estatística mostrou diferença significativa somente para o tratamento ($F_{(1,27)} = 17,96, P < 0,05$), não indicando significância para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 0,83, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0,56, P > 0,05$). O teste de Duncan indicou diminuição significativa para a porcentagem de tempo gasto nos braços fechados para os grupos (V+WAY) e (CET+WAY) em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). Com relação à porcentagem de tempo gasto no centro, a ANOVA de duas vias apontou diferença significativa para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 7,43, P < 0,05$) e ausência de efeitos para o tratamento ($F_{(1,27)} = 10,07, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 35,51, P > 0,05$). A análise *pós-hoc* indicou diminuição na porcentagem de tempo no centro para os grupos (V+WAY) e (CET+V) em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). O teste mostrou ainda aumento neste mesmo índice para o grupo (CET+WAY) em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$).

Com relação aos índices etológicos, a ANOVA de dois fatores indicou diferença significativa para o total de esticar para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 10,0, P < 0,05$) e tratamento ($F_{(1,27)} = 15,32, P < 0,05$) e ausência de efeitos para a interação entre pré-

tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 3,98, P > 0,05$). O teste de Duncan mostrou diminuição no total de esticar para o grupo (CET+V) em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). A análise estatística também apontou diferença significativa na porcentagem de esticar protegido para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 4,48, P < 0,05$) e ausência de efeitos para o tratamento ($F_{(1,27)} = 3,17, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 2,47, P > 0,05$). A análise *pos-hoc* indicou diminuição na porcentagem de esticar protegido para o grupo (V+WAY) em relação ao grupo (V+V) e (CET+WAY) ($P < 0$).

A ANOVA de dois fatores não apontou diferença significativa para o total de mergulhos no pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 0,01, P > 0,05$), tratamento ($F_{(1,27)} = 0,38, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0,38, P > 0,05$). Também não revelou diferença significativa para a porcentagem de mergulhos protegidos no pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 0,83, P > 0,05$), tratamento ($F_{(1,27)} = 2,42, P > 0,05$), e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0,46, P > 0,05$). Com relação ao total de levantamentos, a análise estatística não indicou diferença significativa para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 0,13, P > 0,05$), tratamento ($F_{(1,27)} = 0,08, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0,08, P > 0,05$). A ANOVA de dois fatores apontou diferença significativa com relação ao total de imobilidade para o pré-tratamento ($F_{(1,27)} = 4,25, P < 0,05$), e ausência de efeitos para o tratamento ($F_{(1,27)} = 0, P > 0,05$) e interação entre pré-tratamento e tratamento ($F_{(1,27)} = 0, P > 0,05$). O teste de Duncan, entretanto, não confirmou o efeito no total de imobilidade para o pré-tratamento ($P > 0,05$), assim como para as demais condições experimentais ($P > 0,05$).

Tabela 2. Efeito da injeção combinada de cetanserina na SCP (0 e 10 nmol/0,1µl) e WAY100635 (0 e 5,6 nmol/0,1µl) no NMnR de camundongos avaliados no LCE.

Comportamentos	Veículo (V) 0 + 0	V + WAY 0 + 5,6	CET + V 10 + 0	CET + WAY 10 + 5,6
Total Entradas	17,4 ± 0,6	18,7 ± 1,4	16,2 ± 2,1	15,6 ± 1,1
Entradas BAs	7,4 ± 0,6	10,5 ± 1,4 *	6,3 ± 0,7	7,1 ± 0,6 #
% Tempo BFs	38,0 ± 1,6	27,1 ± 2,8 *	43,3 ± 4,7	27,6 ± 1,7*
% Tempo Centro	30,6 ± 1,6	25,2 ± 2,1*	24,3 ± 1,9 *	42,2 ± 1,5*
Total Mergulhos	15,5 ± 3,2	19,8 ± 3,9	18,1 ± 3,2	19,3 ± 2,1
% Mergulho Protegido	58,7 ± 10,5	39,0 ± 8,0	60,8 ± 11	53,0 ± 5,4
Total Esticar	57,2 ± 4,8	66,1 ± 5,5	33,5 ± 4,9 *	60,7 ± 3,3
% Esticar Protegido	47,6 ± 4,5	29,9 ± 3,8*	53,7 ± 8,1	52,6 ± 3,4#
Total Levantamentos	7,8 ± 1,1	7,7 ± 1,2	8,3 ± 2,3	8,3 ± 1,2
Total Imobilidade	0 ± 0	0 ± 0	14,8 ± 9,8	0 ± 0

Os dados representam a média ± E.P.M dos demais comportamentos avaliados no LCE. BAs = Braços Abertos; BFs= Braços Fechados (n= 7-8)

* $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan).

$P < 0,05$, comparado ao grupo (V+WAY) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan).

Tabela 3. Diferença entre os comportamentos avaliados no LCE após injeção combinada de cetanserina na SCP (0 e 10 nmol/0,1µl) e WAY100635 (0 e 5,6 nmol/0,1µl) no NMnR de camundongos.

Comportamentos	Veículo (V) 0 + 0	V + WAY 0 + 5,6	CET + V 10 + 0	CET + WAY 10 + 5,6
Total Entradas	—	—	—	—
Entradas BAs	—	↑ *	—	↓ #
% Tempo BFs	—	↓ *	—	↓ *
% Tempo Centro	—	↓ *	↓ *	↑ *
Total Mergulhos	—	—	—	—
% Mergulho Protegido	—	—	—	—
Total Esticar	—	—	↓ *	—
% Esticar Protegido	—	↓ *	—	↑ #
Total Levantamentos	—	—	—	—
Total Imobilidade	—	—	—	—

Os dados representam a diferença entre os comportamentos avaliados no LCE. BAs = Braços Abertos; BFs= Braços Fechados (n= 7-8)

- ausência de diferença significativa; ↑ aumento significativo; ↓ diminuição significativa

* $P < 0,05$, comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan)

$P < 0,05$, comparado ao grupo (V+WAY) (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan)

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel dos receptores 5-HT_{2A/2C} localizados na SCP no efeito ansiolítico induzido por infusões intra-NMnR de WAY100635, um antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}. Os resultados deste trabalho sugerem que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A/2C} da SCP suprime o efeito ansiolítico resultante de infusões intra- NMnR de WAY100635 em camundongos expostos ao LCE.

Em 2002, Canto-de-Souza e colaboradores reportaram que injeções intra-NMnR de WAY100635 diminuíram os índices de ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Posteriormente, Nunes-de-Souza et al, (2008) demonstraram que o bloqueio dos receptores 5-HT_{2A/2C} da SCP com cetanserina antagonizou completamente o efeito ansiolítico induzido pela injeção de mCPP (um agonista 5- HT_{2B/2C}) na mesma estrutura, sugerindo portanto, que a serotonina poderia exercer ação ansiolítica atuando sobre receptores 5-HT₂ localizados na SCP de camundongos avaliados no LCE. Tendo em vista estas descobertas e considerando as já bem descritas projeções do NMnR para a SCP (VERTES et al, 1999), nós presumimos que o bloqueio dos receptores 5-HT₂ da SCP poderia suprimir o efeito ansiolítico promovido pela desinibição farmacológica dos neurônios do NMnR.

Estes resultados não só corroboram os obtidos por Canto-de-Souza et al, (2002), mostrando que infusões intra-NMnR de WAY100635 aumentam a exploração dos braços abertos no LCE, como também demonstram que este efeito é completamente bloqueado pelo pré-tratamento com cetanserina na SCP. Cabe ressaltar que nenhum dos antagonistas utilizados, cetanserina e WAY100635, injetados na SCP e no NMnR respectivamente, alteraram as entradas nos braços fechados do LCE, uma medida amplamente utilizada para avaliar a atividade locomotora no aparato (CRUZ et al, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995).

É importante enfatizar que, quando administrada isoladamente, as injeções intra-SCP de cetanserina (CET+V) não alteraram as entradas nos braços abertos, e as porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos. Notou-se que além de suprimir o efeito ansiolítico induzido pelas injeções intra-NMnR de WAY100635, atuando nas medidas diretas de exploração dos braços abertos, as injeções intra-SCP de cetanserina também atenuaram a redução na porcentagem de esticar protegido, efeito produzido pelas injeções de WAY100635 (V+WAY).

Entretanto, o pré-tratamento com cetanserina não foi totalmente desprovido de efeitos comportamentais intrínsecos, na medida em que este antagonista reduziu o tempo gasto na plataforma central e o total de esticar. Ainda que ambos os efeitos possam ser interpretados como indicativos de um fraco efeito ansiogênico, estas alterações não foram acompanhadas por mudanças significativas nas medidas diretas de ansiedade (exploração dos braços abertos), fazendo com que esse efeito possa ser considerado inespecífico.

Apesar a ativação serotoninérgica ter sido considerada inicialmente, como facilitadora da emissão de respostas defensivas como medo e ansiedade, um papel mais complexo tem sido atribuído a este neurotransmissor em função de estudos que vêm esclarecendo os mecanismos de ação dos vários receptores de serotonina e de pesquisas que utilizam injeções de compostos serotoninérgicos diretamente nos sítios cerebrais (GRIEBEL, 1995; MENARDI e TREIT, 1999; MILLAN, 2003). Assim, sabe-se que a serotonina desempenha um papel dual nas respostas de ansiedade (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF et al, 1997; GRAEFF, 2004), e mais especificamente, que esta monoamina pode aumentar ou reduzir a ansiedade dependendo do sítio de ação no sistema nervoso central e do receptor ativado. Esta perspectiva fornece suporte a algumas divergências presentes na literatura. Por exemplo, enquanto injeções intra-NMnR de WAY100635 podem resultar em efeitos ansiogênicos como consequência do aumento da atividade das vias que ligam o NMnR ao

hipocampo (DOS SANTOS et al, 2005; DOS SANTOS et al, 2008), efeitos ansiolíticos têm sido reportados após infusões de WAY100635 no NMnR (CANTO-DE-SOUZA et al, 2002 e presente estudo). Adicionalmente, lesões dos neurônios do NMnR com a neurotoxina 5,7-diidroxitriptamina (5,7-DHT), podem resultar em efeitos ansiogênicos (NETTO et al, 2002), ansiolíticos (ANDRADE et al, 2001) e até mesmo indicar ausência de efeitos no LCE (THOMAS et al, 2000).

Mais divergências são encontradas quando se trata da manipulação de receptores 5-HT₂ em áreas pós-sinápticas como amígdala e hipocampo, duas estruturas críticas envolvidas na regulação das respostas emocionais (WHITTON e CURZON, 1990; DUXON et al, 1997; ALVES et al, 2004; CORNÉLIO e NUNES-DE-SOUZA, 2007). Em ratos, infusões de BW723C86 (agonista 5-HT₂) na amígdala medial reduziram os índices de ansiedade no teste de interação social e LCE, efeitos que foram bloqueados pelo antagonista 5-HT₂ SB200646A (DUXON et al, 1997). Entretanto, em camundongos, Cornélio e Nunes-de-Souza (2007) demonstraram que injeções de mCPP (agonista 5-HT_{2B/2C}) na amígdala resultou em aumento da ansiedade no LCE, efeito que foi seletivamente e completamente bloqueado pela injeção do antagonista seletivo 5-HT_{2C} SDZSER082. Além disso, efeitos ansiogênicos têm sido reportados após infusões de mCPP no hipocampo dorsal e de TFMPP ou MK-212 (agonista não seletivo e preferencial 5-HT_{2C} respectivamente) no hipocampo ventral de ratos avaliados no teste de interação social e LCE (WHITTON e CURZON, 1990; ALVES et al, 2004). Em camundongos, contudo, injeções de mCPP no hipocampo dorsal e ventral não alteraram os índices de ansiedade no LCE (CORNÉLIO e NUNES-DE-SOUZA, 2007).

Embora resultados contraditórios resultantes da manipulação de receptores serotoninérgicos na amígdala e hipocampo contrastem com os efeitos quase que invariavelmente ansiolíticos observados após infusões de agonistas 5-HT_{1A} e 5-HT₂ na SCP

de ratos (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF et al, 1997; GRAEFF, 2004), algumas inconsistências têm sido recentemente reportadas com relação à própria SCP. Gomes e Nunes-de-Souza (2009) demonstraram que injeções de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT_{1A} não alterou os índices de ansiedade de camundongos avaliados no LCE. Soares e Zangrossi (2004, 2009) verificaram que no labirinto em T elevado (LTE), injeções intra SCP de 5-HT podem exercer efeitos bidirecionais no que diz respeito às respostas relacionadas à ansiedade em ratos. Assim, microinjeções intra-SCP de 5-HT inibiram a fuga dos braços abertos do LTE (efeito panicolítico), enquanto facilitaram a aquisição de esQUIVA inibitória (efeito ansiogênico). Ambos os efeitos foram antagonizados pela administração prévia de cetanserina e SDZ SER 082 (antagonista preferencial 5-HT_{2C}). Yamashita et al, (2011), afirmaram que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} com o agonista MK-212 na porção dorsal da SCP resulta em efeito ansiogênico, que é bloqueado pela injeção prévia de SB242084 (antagonista 5-HT_{2C}) em ratos avaliados no LTE. Em contrapartida, Gomes e Nunes-de-Souza (2009), demonstraram que infusões intra-SCP do mesmo agonista dos receptores 5-HT_{2C} (MK-212) resultaram em efeito ansiolítico em camundongos avaliados no LCE. Ainda neste estudo, injeções intra-SCP de DOI (agonista 5-HT_{2A}) diminuíram os índices de ansiedade apenas em camundongos reexpostos ao LCE. Estas discrepâncias relacionadas ao papel dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} (especialmente o 5-HT_{2C}) da SCP podem estar relacionadas aos diferentes testes utilizados para avaliar a resposta de ansiedade (LCE x LTE) e/ou às diferentes espécies de animais utilizadas (camundongos x ratos).

Dessa forma, como a cetanserina, um antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}, foi capaz de bloquear tanto o efeito ansiolítico produzido por injeções de mCPP (agonista 5-HT_{2B/2C}) na SCP (Nunes-de-Souza et al, 2008), quanto o efeito ansiolítico obtido após infusões de WAY100635 no NMnR, os resultados deste trabalho demonstram que a ativação dos receptores 5-HT₂ da SCP desempenham um papel no efeito ansiolítico induzido por injeções

de WAY100635 no NMnR. Dado o perfil farmacológico da cetanserina (5-HT_{2A/2C}) (BARNES e SHARP, 1999), mais estudos utilizando ligantes mais seletivos seriam necessários para verificar qual subtipo específico do receptor 5-HT₂ está envolvido nessa neurocircuitaria de defesa.

CONCLUSÕES

- O bloqueio dos autorreceptores 5-HT_{1A} do NMnR com WAY100635 resulta em efeito ansiolítico em camundongos avaliados no LCE.
- O bloqueio de receptores 5-HT_{2A/2C} da SCP com cetanserina não altera os índices comportamentais de ansiedade avaliados no LCE.
- A administração prévia na SCP de uma dose inativa de cetanserina bloqueia o efeito ansiolítico obtido pelo WAY100635 microinjetado no NMnR de camundongos submetidos ao LCE.
- A atenuação da ansiedade resultante do aumento da liberação de serotonina em sítios pós-sinápticos como a SCP pode decorrer da ativação de receptores 5-HT₂ desta estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOWSKI, D., RIGO, M., DUC, D., HOYER, D., STAUFENBIEL, M. Localization of the 5-hydroxytryptamine 2C receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacol*, 34, 1635-1645, 1995.
- ADAMEC, R.E., SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol and Behav*, 54 (1), 101-109, 1993.
- ADAMS, D.B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. *Behav and Brain Sci*, 2, 201-241, 1979.
- ADELL, A., CARCELLER, F., ARTIGAS, F. In vivo brain dialysis study of somatodendritic release of serotonin in the raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem*, 60: 1673-1681, 1993.
- ADELL A, ARTIGAS F. Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *Eur J Neurosci*. 11: 2305-11, 1999.
- ADELL A, CELADA P, TERESA ABELLÁN M, ARTIGAS F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev*. 39: 154-80, 2002.
- AGHAJANIAN, G.K. Chemical-feedback regulation of serotonin-containing neurons in brain. *Ann NY Acad Sci*; 193: 86-94, 1972.
- AGUIAR, D.C., MOREIRA, F.A., GUIMARÃES, F.S. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav*, 83:296–301, 2006.
- ALVES, S.H., PINHEIRO, G., MOTTA, V., LANDEIRA-FERNANDES, J., CRUZ, A.P.M. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol*, 15:37-43, 2004.
- ANDRADE, T.G.C.S., GRAEFF, F.G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesion of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 70: 1-14, 2001.
- ANDREWS, N., HOGG, S., GONZALEZ, L.E., FILE, S.E. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. *Eur J Pharmacol*, 264: 259-64, 1994.

AVANZI, V., BRANDÃO, M.L. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behav Brain Res*, 126: 175-84, 2001.

AVANZI, V., SILVA, R.C.B., MACEDO, C.E., BRANDÃO, M.L. 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. *Physiol Behav*, 78:471-77, 2003.

AZMITIA, E.C., SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe. *J. Comp. Neurol*, 179, 178-184, 1978.

BAKER KG, HALLIDAY GM, HORNUNG JP, GEFFEN LB, COTTON RGH, TÖRK I. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neurosci*, 42: 757-75, 1991.

BANDLER, R., DEPAULIS, A., VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behav Brain Res*, 15(2):107-19, 1985.

BANDLER, R., CARRIVE, P., ZHANG, S.P. Integration of somatic autonomic reactions within the periaqueductal Gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Progress in Brain Res*, 87, 269-305, 1991.

BANDLER, R., SHIPLEY, M.T., Columnar organization in the midbrain periaqueductal Gray: modulates for emotional expression? *Trends Neurosci*, 17, 379-389, 1994

BARNES, N.M. e SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol*, 38, 1083-1152, 1999.

BAXTER, G., KENNETT, G., BLANEY, F.,BLACKBURN, T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united?. *Trends Pharmacol Sci*, 105, 105-110, 1995.

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

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal grey. *Progress in Neurobiol.* 46, 575-605, 1995.

- BEITZ, A.J. Central Gray. In: PAXINOS G. (ed). *The Human Nervous System*. 1 ed., San Diego, Academic Press, 307-320, 1990.
- BERTOGLIO L.J.; ANZINI, C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; CAROBREZ, A.P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus maze trial 2 in rats. *Behav Brain Res*, 162, (1), 99-107, 2005.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*. 39, 43–68, 1988.
- BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., RODGERS, R.J. Pharmacological and Neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggressive Behav*. 16, 165-176, 1990.
- BLANCHARD, R.J., YUDKO, E.B., RODGERS, R.J., BLANCHARD, D.C. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res*. 58, 155-165, 1993.
- 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 and Biobehav Rev*. 21, 783-789, 1997.
- BLANCHARD, D.C, GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci and Biobehav Rev*, 25, 205-218, 2001.
- BOBILLIER, P., PETIJEAN, F., SALVERY, D., LIGIER, M., SEGUIN, S. Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res*, 85, 205-210, 1975.
- BONHAUS, D.W., BACH, C., DE SOUZA, A., SALAZAR, R.F.H., MATSOUKA, B.D., ZUPPAN, P., CHAN, H.W., ENGLAN, R.M. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine 2B (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brazilian J Pharmacol*, 115, 622-628, 1995.
- BORELLI, K.G., GÁRGARO, A.C., SANTOS, J.M., BRANDÃO, M.L. Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neurosci Lett*, 387: 105-110, 2005.

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

BRANDÃO, M.L., ANSELONI, V.Z., PANDÓSSIO, J.E., DE ARAÚJO, J.E., CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 863-875, 1999.

BRANDÃO, M.L., VIANNA, D.M., MASSON, S., SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. *Rev Bras Psiq.* 25 (Supl II), 36-41, 2003.

BURT A.M. *Neuroanatomia*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 412 pp, 1993.

CANTERAS, N.S., SWANSON, L.W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10089-10093, 1992.

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

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

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

CARLI, M., SAMANIN, R. Potential anxiolytic properties of 8-hydroxy-2-(Di-N-propylamino)tetralin, a selective serotonin 1A receptor agonist. *Psychopharmacol*, 94: 84-91, 1988.

CARLSON N.C. *Fisiologia do Comportamento*. Manole: São Paulo. 699 pp, 2002.

CAROBREZ, A.P., TEIXEIRA, K.V., GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev*, 25 (7-8), 697-709, 2001.

CAROBREZ, A.P., BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, 29, 1193-1205, 2005.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. *Behav Brain Res*, 58, 27-47, 1993

CARVALHO-NETTO, E.F., MARKHAM, C., BLANCHARD, C.D., NUNES-DE-SOUZA, R.L., BLANCHARD, R.J. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 85:140 – 147, 2006.

CASTILHO, V.M., DE MACEDO, C.E., BRANDÃO, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacol*, 165:77-85, 2002.

CHOPIN, P., BRILEY, M. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify serotonergic function. *Trends Pharmacol Sci*, 8, 383-388, 1987.

CLEMETT, D.A., PUNHANI, T., DUXON, M.S., BLACKBURN, T.P., FONE, K.C.F. Immunohistochemical localization of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacol* 39, 123–132, 2000.

COMOLI, E., RIBEIRO-BARBOSA, E.R., CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res*, 138, 17-28, 2003.

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

COSTALL, B., NAYLOR, R.J. Anxiolytic effects of 5-HT₃ antagonists in animals. In: WILEY, J. 5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: Their comparative behavioural pharmacology. Rodgers, R.J., Cooper, S.J. (eds). Chichester, 133-158, 1991.

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

CRUZ, A.P.M., PINHEIRO, G., ALVES, S.H., FERREIRA, G., MENDES, M., FARIA, L., MACEDO, C.E., MOTTA, V., LANDEIRA-FERNANDES, J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacol*, 182:345-54, 2005.

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in the cell body of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*, 62, (232), 1-55, 1964.

DARWIN, C. A expressão das emoções no homem e nos animais. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.

DE ALMEIDA, R.M., GIOVENARDI, M., CHARCHAT, H., LUCION, A.B. 8-OH-DPAT in the median raphe nucleus decreases while in the medial septal area it may increase anxiety in female rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 259-64, 1998.

DE OCA, B.M., DECOLA, J.P., MAREN, S., FANSELOW, M.S. Distinct regions of the periaqueductal Gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *J Neurosci*, 18(9): 3426-32, 1998.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacol*, 5 (4), 305-315, 1991.

DEAN, P., REDGRAVE, P., WESTBY, M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci*, 12 (4), 137-147, 1989.

DI SCALA, G., SCHMITT, P., KARLI, P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Res*, 309(2):199-208, 1984.

DOS SANTOS, L., ANDRADE, T.G.C.S., ZANGROSSI, H. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T maze test of anxiety. *Psychopharmacol*, 179: 733-41, 2005.

DOS SANTOS, L., ANDRADE, T.G.C.S., ZANGROSSI, H. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur Neuropsychopharmacol*, 18: 286-94, 2008.

DUDLEY, T.E., DINARDO, L.A., GLASS, J.D. In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*, 81: 1469-77, 1999.

DUXON, M.S., FLANIGAN, T.P., REAVLEY, A.C., BAXTER, G.S., BLACKBURN, T.P., FONE, K.C. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine 2B receptor protein in the neural nervous system. *Neurosci*, 76, 323-329, 1997.

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

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

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action: In: ELLIOT, J.M., HEAL, D.J., MARSDEN, C.A. *Experimental Approaches to anxiety and depression*. J. Willey, Chichester, 25-44, 1992.

FILE, S.E, GONZALEZ, L.E., ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci*, 16 (15), 4810-4815, 1996.

FORNAL, C.A., METZLER, R.A., GALLEGOS, R.A., VEASEY, S.C., McCREARY, A.C., JACOBS, B.L. WAY100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine 1A antagonist increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY100135. *J Pharmacol Exp Ther*, 278: 752-762, 1996.

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

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

GOMES, K.S., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5-HT_{2A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 33, 1261-1269, 2009.

GRAEFF, F.G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G.D.; NOYES, R. (ed). Handbook of anxiety, 3rd. ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 307-354, 1990.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res*, 27: 811-29, 1994.

GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S., ANDRADE, T.G.C.S., DEAKIN, J.F.W. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1):129-141, 1996.

GRAEFF, F.G., VIANA, M.B., MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci a Biobehav Rev*, 21 (6), 791-799, 1997.

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

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

GRAY, J.A. (Ed.) *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. London: Oxford University Press, 1982.

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

GRIEBEL, G., SANGER, D.J., PERRAULT, G. The use of the rat plus-maze to discriminate non selective and BZ-1 (ω 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacol*, 124, 245-254, 1996.

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

HADDJERI, N., FAURE, C., LUCAS, G., MNIE-FILALI, O., CHOUVET, G., ASTIER, B., RENAUD, B., BLIER, P., DEBONNEL, G. In vivo modulation of central 5-hydroxytryptamine

(5-HT_{1A}) receptor-mediated responses by the cholinergic system. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7: 391-99, 2004.

HALL, H., LUNDKVIST, C., HALLDIN, C., FARDE, J., PIKE, V.W., McCARRON, J.A. Autoradiographic localization of 5-HT_{1A} receptor in the post-mortem human brain using [³H] WAY100635 and [¹¹C] WAY100635. *Brain Res*, 745:96-108, 1997.

HANDLEY, S., MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 327, 1-5, 1984.

HANDLEY, S. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther*, 66, 103-148, 1995.

HENSLER JG. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 30: 203–14, 2006.

HESS, W.R., BRÜGGER, M. Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaktion. *Helvetica Psysiol Pharmacol Act*, 1, 33-52, 1943.

HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. (Ed.) *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Editora Atheneu, 191-205, 2003.

HOFFMANN B., LEFKOWITZ R.J. Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonists. In: Goodman & Gilman’s: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9 ed. Mc Graw Hill. 1905 pp, 1996.

HOPWOOD SE, STAMFORD JA. Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via α_1 and α_2A adrenoceptors. *Neuropharmacol.* 41: 433–42, 2001.

HORNUNG J.P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanatomy.* 26: 331–43, 2003.

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). *J Pharmacol Exp Ther*, 46, 157-203, 1994.

JENCK, F., MOREAU, J.L., MARTIN, J.R. Dorsal periaqueductal Gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res*, 57(2), 181-191, 1995.

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

JUDGE SJ, GARTSIDE SE. Firing of 5-HT neurones in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential alpha1-adrenoceptor and 5-HT1A receptor modulation. *Neurochem Int*. 48: 100-7, 2006.

KALSNER, S. The question of feedback at somatodendritic region and the antidepressant drug action. *Brain Res Bull*, 52: 467-473, 2000.

KANDEL E.R, SCHWARTZ J.H, JESSELL T.M. *Princípios da Neurociência*. Manole: São Paulo, 4 ed, 2003.

KEAY, K.A., BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 669-678, 2001.

KENNETT, G.A., PITTSWAY, K., BLACKBURN, T.P. Evidence that 5-HT_{2C} receptor antagonists are anxiolytic in the Geller-seifter model of anxiety. *Psychopharmacol*, 114, 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-HT₄ receptor antagonists in three rat models of anxiety. *Brit J Pharmacol*, 20, p.137, 1997.

KIA, H.K., MIGUEL, M.C., BRISORGUEIL, M.J., DAVAL, G., RIAD, M., EL MESTIKAWY, S., HAMOM, M., VERGÉ, D. Immunocytochemical localization of serotonin 1A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 365: 289-305, 1996.

KINGSLEY R.E. *Manual de Neurociências*. Guanabara & Koogan: Rio de Janeiro, 2 ed, 2000.

KOSOFKY, B.E., MOLLIVER, M.E. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminal arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*, 1,153-168, 1987.

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

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

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

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 46 (3), 321-340, 1990.

LOVICK, T.A. Influence of the dorsal and median raphe nuclei on neurons in the periaqueductal gray matter: role of 5-hydroxytryptamine. *Neurosci*, 59: 993-1000, 1994.

LUCKI, I. 5HT1 receptors and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 16, 83-93, 1992.

MACNAUGHTON, N., CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 285-305, 2004.

MAGOUN, H.W., ATLAS, D., INGERSOLL, E.H., RANSOM, S.W. Associated facial, vocal and respiratory components of emotional expression: An experimental study. *J Neurol Psychopathol*, 17, 241-255, 1937.

MAMOUNAS, L.A., MOLLIVER, M.E. Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). *Exp. Neurol*, 102, 23-36, 1988.

MANTHY, P.H. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a nissl weiss and golgi analysis. *J Com Neurol*, 204, 146-158, 1982.

MARKS, I.M. Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders. New York: Oxford University Press, p.53-81, 1987.

MARUCCI, F.A.F., FACHINI, G., CANTO-DE-SOUZA, A. Agonista dos receptores 5-HT₃ produz efeito ansiogênico em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. In: XIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. São Carlos, SP, 2006.

McQUADE, R., SHARP, T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem*, 69:791-96, 1997.

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

MENARD, J., TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosc Biobehav Rev*, 23, 591-613, 1999.

MESSIER, C., ÉMOND, S., ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav*, 63 (2), 313-318, 1999.

MIGUEL, T.T., NUNES-DE-SOUZA, R. L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res*, 1076:42-8, 2006.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 70, 83-244, 2009.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiol Clin* 33 (2), 55-66, 2003.

MOKLER D.J, DUGAL J.R, HOFFMAN J.M, MORGANE, P.J. Functional interrelations between nucleus raphé dorsalis and nucleus raphé medianus: a dual probe microdialysis study of glutamate-stimulated serotonin release. *Brain Res Bull*. 78: 132-8, 2009.

MOLLIVER, M.E. Serotonergic neural systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clinical Pharmacol*, 7, 3-23, 1987.

MUNDEY, M.K., FLETCHER, A., MARSDEN, C.A. Effects of 8-OH-DPAT and 5-HT_{1A} antagonists WAY100135 and WAY100635 on guinea-pig behavior and dorsal raphe 5-HT neurone firing. *Br J Pharmacol*; 117: 750-56, 1996.

NETTO, S.M., SILVEIRA, R., COIMBRA, N.C., JOCA, S.R.I., GUIMARÃES, F.S. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Prog Neuro-Psychopharmacol Bio Psychiatry*, 26, 1135-1141, 2002.

NIC DHONNCHADHA, B.A., BOURIN, M., HASCOET, M. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res*, 203-214, 2003.

NUNES-DE-SOUZA, R. L., CANTO-DE-SOUZA, A., DA-COSTA, M., FORNARI, R.V., PELÁ, I.R., GRAEFF, F.G. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacol*, 150, 300-310, 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 Res*, 9:87-96, 2002.

NUNES-DE-SOUZA, V., NUNES-DE-SOUZA, R.L., RODGERS, R.J., CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res*, 187, 72-79, 2008.

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. *Pharmacol Ther*, 47, 233-266, 1990.

OLIVEIRA, L.C., BROIA, A.C., DE MACEDO, C.E., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., BRANDÃO, M.L. 5-HT₂ receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychopharmacol*, 191:253-62, 2007.

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

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E. e BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 14, 149-167, 1985.

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

POMPEIANO, M., PALACIOS, J.M., MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol Brain Res*, 23, 163-178, 1994.

RODGERS, R.J., COLE, J.C., COBAIN, M.R., DALY, P., DORAN, P.J., EELLS, J.R., WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol*, 3, 621-634, 1992.

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

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

SEWARDS, T.V., SEWARDS, M.A. Fear and power dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev*, 26, 553-579, 2002.

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

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

SHEPHERD, J.K., GREWAL, S.S, FLETCHER, A., BILL, D.J. DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterization of the elevated zero-maze as an animal model of anxiety. *Psychopharmacol*, 116, 56-64, 1994.

SILVA, R.C.B., GÁRGARO, A.C., BRANDÃO, M.L. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behav Brain Res*, 151: 93-101, 2004.

SOARES, V.P., ZANGROSSI, H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull*, 64:181-188, 2004.

SOARES, V.P., ZANGROSSI, H. Stimulation of 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A} receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic, but not panicolytic-like effect in rats. *Behav Brain Res*, 197, 178-185, 2009.

STAMP J, SEMBA, K. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res*, 677: 39-49, 1995.

STEPHENS, D.N., MELDRUM, B.S., WEIDMANN, R., SCHNEIDER, C., GRUTSNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 3-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacol.* 90, 166-169, 1986.

TAKASE L.F, NOGUEIRA M.I. Patterns of Fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. *Brain Res*, 1200: 10-18, 2008.

THOMAS, H., FINK, H. SOHR, R., VOITS, M. Lesions of the median raphe nucleus : a combined behavioural and microdialysis study in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 65, 15-21, 2000.

TÖRK, J., HORNUNG, J.P. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In Paxinos, G. (ed.) *The Human Nervous System*. San Diego, CA, Academic Press, 1001-1022, 1990.

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

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

VERTES, R.P., FORTIN, W.J., CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *Journal Comp Neurolo.* 407, 555-582, 1999.

VERTES R.P, LINLEY S.B. Comparison of projections of the dorsal and median raphe nuclei, with some functional considerations. *Inter Congress Series.* 1304: 98-120, 2007.

VIANNA, D.M.L., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., BRANDÃO, M.L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 711-719, 2001.

WALTHER D, BADER M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*, 66: 1673-80, 2003.

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

WIRTSHAFER D. The control of ingestive behavior by the median raphe nucleus. *Appetite*. 36: 99-105, 2001.

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*, 351, 357-373, 1995.

YAMASHITA, P.S., DE BORTOLI, V.C., ZANGROSSI, H. 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal Gray. *Neuropharmacol*, 60, 216-222, 2011.

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

APÊNDICE

Quadro 1: Registro das medidas convencionais em camundongos submetidos ao LCE após injeção combinada de cetanserina (10nmol/0,1µl) na SCP e WAY100635 (5,6nmol/0,1µl) no NMR.

Veículo + Veículo

Sujeito	TENTR	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
verm 3	15	6	9	97	102	101	40,00	60,00	32,33	34,00	33,67
verde2	17	10	7	102	119	79	58,82	41,18	34,00	39,67	26,33
verde3	17	7	10	87	103	110	41,18	58,82	29,00	34,33	36,67
verde4	20	9	11	78	132	90	45,00	55,00	26,00	44,00	30,00
verde1	18	7	11	93	98	109	38,89	61,11	31,00	32,67	36,33
verde2	18	8	10	92	124	84	44,44	55,56	30,67	41,33	28,00
verde3	17	5	12	107	122	71	29,41	70,59	35,67	40,67	23,67
Média	17,4286	7,42857	10	93,7143	114,286	92	42,535	57,465	31,2381	38,0952	30,6667
DPM	1,51186	1,71825	1,63299	9,5867	13,124	15,1217	8,83953	8,83953	3,19557	4,37465	5,04058
EPM	0,57143	0,64944	0,61721	3,62343	4,96039	5,71548	3,34103	3,34103	1,20781	1,65346	1,90516

Veículo + WAY100635

Sujeito	TENTR	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
azul 2	11	5	6	135	58	107	45,5	54,5	45,0	19,3	35,7
azul2	25	19	6	223	37	40	76,0	24,0	74,3	12,3	13,3
azul1	16	8	8	165	89	74	50,0	50,0	55,0	29,7	24,7
azul3	17	8	9	122	102	76	47,1	52,9	40,7	34,0	25,3
verde 1	21	14	7	101	115	84	66,7	33,3	33,7	38,3	28,0
azul1	19	9	10	118	93	89	47,4	52,6	39,3	31,0	29,7
azul3	23	11	12	148	91	61	47,8	52,2	49,3	30,3	20,3
azul4	18	10	8	159	67	74	55,6	44,4	53,0	22,3	24,7
Média	18,75	10,50	8,25	146,38	81,50	75,63	54,49	45,51	48,79	27,17	25,21
DPM	4,37	4,31	2,05	37,74	25,53	19,72	11,11	11,11	12,58	8,51	6,57
EPM	1,46	1,44	0,68	12,58	8,51	6,57	3,70	3,70	4,19	2,84	2,19

Cetanserina + Veículo

Sujeito	TENTR	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
verde 1	6	3	3	36	189	75	50,00	50,00	12,00	63,00	25,00
verm 2	7	4	3	200	59	41	57,14	42,86	66,67	19,67	13,67
preto1	18	6	12	98	113	89	33,33	66,67	32,67	37,67	29,67
verm1	19	7	10	75	164	61	36,84	63,16	25,00	54,67	20,33
verde2	20	8	12	80	149	71	40,00	60,00	26,67	49,67	23,67
verde3	19	6	13	90	125	85	31,58	68,42	30,00	41,67	28,33
azul3	21	9	10	88	140	72	42,86	57,14	29,33	46,67	24,00
verde 1	20	8	12	109	101	90	40,00	60,00	36,33	33,67	30,00
Média	16,25	6,375	9,375	97	130	73	41,4693	58,5307	32,3333	43,3333	24,3333
DPM	6,08863	2,06588	4,06861	46,8706	40,1675	16,327	8,53648	8,53648	15,6235	13,3892	5,44234
EPM	2,15266	0,7304	1,43847	16,5713	14,2014	5,77247	3,0181	3,0181	5,52376	4,73379	1,92416

Cetanserina + WAY100635

Sujeito	TENTR	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
verde2	16	7	9	80	100	120	43,75	56,25	26,66	33,30	40,60
verde3	14	6	8	101	87,7	111,3	42,80	57,20	33,60	29,20	37,90
preto2	21	11	10	99	67,3	133,7	52,30	47,70	33,00	22,40	44,50
verm3	12	5	7	105	77,6	117,4	41,60	58,40	35,00	25,80	50,50
verm4	15	7	8	119	62	119	45,40	54,60	39,60	20,60	39,60
azul1'	16	8	8	85,6	76	138,4	50,00	50,00	28,50	25,30	46,10
azul2'	12	5	7	72,7	105,7	121	41,66	58,40	24,20	35,20	40,30
azul3'	19	8	11	96,7	88,2	115,1	42,1	57,8	32,2	29,4	38,3
Média	15,625	7,125	8,5	94,875	83,0625	121,988	44,9513	55,0438	31,595	27,65	42,225
DPM	3,15945	1,95941	1,41421	14,8392	15,2083	9,28215	4,07008	4,06724	4,93752	5,07937	4,40803
EPM	1,11704	0,69276	0,5	5,24645	5,37693	3,28174	1,43899	1,43799	1,74568	1,79583	1,55847

Quadro 2: Registro das medidas etológicas em camundongos submetidos ao LCE após injeção combinada de cetanserina (10nmol/0,1µl) na SCP e WAY100635 (5,6nmol/0,1µl) no NMR.

Veículo + Veículo

Sujeito	%ESTICADAS			%MERGULHOS			%LEVANTAMENTOS			IMOBILIDADE
	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL
1	55	54,5	45,5	6	66,6	33,3	10	100	0	0
2	37	48,6	51,4	15	53,3	46,7	10	100	0	0
3	73	34,2	65,8	26	23	77	5	100	0	0
4	64	28,1	71,9	23	26	74	11	100	0	0
5	67	53,7	46,3	11	81,8	18,2	5	100	0	0
6	61	62,2	37,8	5	100	0	4	100	0	0
7	44	52,2	47,8	23	60,8	39,2	10	100	0	0
Média	57,281	47,642	52,357	15,571	58,785	41,243	7,857	100	0	0
DPM	12,867	12,110	12,110	8,597	27,925	27,930	,0237	0	0	0
EPM	4,863	4,577	4,574	3,2503	10,554	10,556	1,142	0	0	0

Veículo + WAY100635

Sujeito	%ESTICADAS			%MERGULHOS			%LEVANTAMENTOS			IMOBILIDADE
	Total	Prot.	Despr.	Total	Prot.	Despr.	Total	Prot.	Despr.	Total
1	38	15,79	84,21	12	83,3	16,6	6	100	0	0
2	62	14,52	85,48	40	12,5	87,5	2	100	0	0
3	70	40,00	60,00	7	39,2	60,8	12	100	0	0
4	84	22,62	77,38	28	39,2	60,8	12	100	0	0
5	75	38,67	61,33	29	27,5	72,5	10	100	0	0
6	84	30,95	69,05	13	30,8	69,2	6	100	0	0
7	52	34,62	65,38	15	20	80	8	100	0	0
8	64	42,19	57,81	15	60	40	6	100	0	0
Média	66,125	29,918	70,081	19,875	39,062	60,925	7,75	100	0	0
DPM	15,788	10,96729	0,96729	11,19231	22,88567	22,9133	3,453776	0	0	0
EPM	5,581	3,877	3,877	3,957	8,091	8,101	1,221	0	0	0

Cetanserina + Veículo

Sujeito	%ESTICADAS			%MERGULHOS			%LEVANTAMENTOS			IMOBILIDADE
	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL
1	46	34,7	65,3	13	61,5	38,5	7	100	0	51,8
2	22	37,5	62,5	12	33,3	66,6	3	100	0	67
3	33	63,3	36,4	20	75	25	8	100	0	0
4	48	54,1	45,8	22	100	0	23	100	0	0
5	19	80,2	19,8	4	75	25	4	100	0	0
6	13	92,3	7,6	19	94,1	5,8	4	100	0	0
7	40	30	70	36	11,1	88,9	12	100	0	0
8	47	38,2	61,7	19	36,8	63,1	7	100	0	0
Média	33,5	53,787	46,137	18,125	60,85	32	8,5	100	0	14,85
DPM	13,90786	23,02126	23,0536	9,280356	31,28583	25,86845	6,524678	0	0	27,79532
EPM	4,917	8,139	8,150	3,281	11,061	9,145	2,306	0	0	9,827

Cetanserina + WAY100635

Sujeito	%ESTICADAS			%MERGULHOS			%LEVANTAMENTOS			IMOBILIDADE
	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL	Prot.	Despr.	TOTAL	Prot.	Desp.	TOTAL
1	51	62,7	37,2	18	38,8	61,2	6	100	0	0
2	68	45,5	54,4	16	56,25	43,7	11	100	0	0
3	69	53,6	46,3	28	42,8	57,2	6	100	0	0
4	57	61,4	38,5	20	70	30	5	100	0	0
5	60	48,3	51,6	17	52,9	47	10	100	0	0
6	63	41,2	58,8	24	62,5	37,5	10	100	0	0
7	52	55,7	44,2	13	38,4	61,5	7	100	0	0
8	66	53	47	19	63,1	36,8	12	100	0	0
Média	60,75	52,675	47,25	19,375	53,093	46,862	8,375	100	0	0
DPM	6,964194	7,45496	7,476439	4,718883	12,01548	12,01165	2,66927	0	0	0
EPM	3,391	3,427	3,427	2,154	5,484	5,487	1,208	0	0	0